C.S.A.7
ESA

Ano 1944
Tomo 41
Fascículo 2

1945
relat

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Rio de Janeiro - Brasil

1945

(1944)
IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO — BRASIL

ÍNDICE

Tomo 41 Outubro, 1944 Fascículo 2

	pág.
FURTADO, ADOLFO DA ROCHA — Pesquisa da atividade antibacteriana em 180 amostras de *Aspergillus* ..... 205 a	2
CRUZ, W.O., PIMENTA DE MELLO, R. — Eliminação urinária de cloreto de sódio na anemia Ancilostomótica ..... 223 a	2
WERNECK, FÁBIO LEONI — Nota sôbre *Linognathus cervicaprae* (*Anoplura*) ..... 233 a	2
DA CUNHA, ARISTIDES MARQUES, LEÃO, A. E. DE ARÊA, GUIMARÃES, F. NERY, e CARDOSO, HUMBERTO T. — Ensaios terapêuticos com Penicilina. II — Bouba (Framboesia, pian, yaws) Continuação..... 237 a	2
LEÃO, A. E. DE ARÊA, GUIMARÃES, F. NERY, e NÓBREGA, GENARD Ensaios terapêuticos com Penicilina. III — Sífilis. Nota prévia..... 247 a	2
WERNECK, FÁBIO LEONI — O Malófago do Urso dos Andes..... 257 a	2
DA CUNHA, ARISTIDES MARQUES — Infecções experimentais na Leishmaniose tegumentar americana..... 263 a	2
TORRES, C. MAGARINOS — Sôbre a Hiperplasia celular no mixoma infectuoso do coelho ..... 283 a	3
MUNIZ, JÚLIO, e FREITAS, GILBERTO DE — Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pela reação de imunidade. I — Estudo comparatório entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento. 303 a	3
OLIVEIRA, LEJEUNE P. H. DE — Sôbre uma nova espécie de Crustácea Stomatopoda: *Squillerichtus Aragoi* ..... 335 a	3
DAMASCENO, R. G. e CAUSEY, O. R. — Estudo sôbre flebotomos no vale amazônico. Parte I. Descrição de *F. Marajoensis, F. Pilosus, F. Souzacastroi e F. Christophersoni* (*Diptera, Psychodidae*) ..... 339 a	3
LACÔRTE, J. GUILHERME, CARDOSO, HUMBERTO. T., e SANTOS, MÁRIO — Estudos sôbre o pneumococo — 1.ª nota — Experiências sôbre a produção de peroxido pelo pneumococo e reação para evidenciá-la ..... 351 a	3
LACÔRTE, J. GUILHERME, e SANTOS, MÁRIO — Estudos sôbre o pneumococo — 2.ª nota — Relação entre a virulência do pneumococo. a sua bisibilidade pela bile e a capacidade de formar peroxido..... 353 a	3
AZEVEDO, A. PENNA DE, e SALLES, JÔNIO F. — Simpatogônioma da glândula suprarrenal em natimorto a têrmo ..... 355 a	3

As **MEMÓRIAS,** órgão oficial do Instituto Oswaldo Cruz, editadas sob a direção do Dr. H. C. de Souza-Araujo, s reservadas, exclusivamente, à publicação de trabalhos n realizados, e aparecerão em fascículos bimensais ou t mensais.

Tôda a correspondência deverá ser dirigida à:

REDAÇÃO DAS MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ
CAIXA POSTAL 926 — ENDERÊÇO TELEGRÁFICO: "MANGUINHOS", R
RIO DE JANEIRO — BRASIL

MEMÓRIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo 41 Outubro, 1944 Fascículo 2

Pesquisa da atividade antibacteriana com 180 amostras de Aspergillus Micheli, 1729 (*)

por

Adolpho da Rocha Furtado

Biologista

Com a recente descoberta de diversas substâncias antibióticas, o estudo da atividade antibacteriana tem assumido grande importância. Todavia, as pesquisas têm sido orientadas, em geral, para a análise das espécies que se mostraram positivas. E' o caso da vasta literatura e das numerosas pesquisas em torno do *Penicillium notatum*, produtor da penicilina, do *Aspergillus flavus*, produtor do ácido aspergílico, flavicina e flavacidina, bem como de várias outras espécies com atividade já demonstrada.

Aos que trabalham em Micologia, cumpre investigar novas espécies antibióticas. Nesse sentido, conhecemos, apenas, o trabalho de WILKINS e HARRIS (1942), que pesquisaram a atividade em 100 amostras de cogumelos.

Com o presente trabalho — continuação de nossos estudos sôbre atividade antibacteriana — apresentamos os resultados de nossas últimas pesquisas, realizadas na Secção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Estudamos 180 amostras do gênero *Aspergillus*, das quais 132 distribuidas em 36 espécies.

(*) Recebido para publicação a 10 de julho e dado à publicidade em outubro de 1944.

Todas as culturas foram repicadas em meio Czapek-Dox sólido, afim de trabalharmos sempre com amostras recentes. Do meio sólido, quando já estavam bem desenvolvidas, semeamos em meio líquido, cuja fórmula — original do Dr. ARÊA LEÃO — já publicamos em nosso trabalho anterior sôbre *Aspergillus flavus* (1944).

As amostras apresentaram bom desenvolvimento, à temperatura ambiente.

Fizemos a pesquisa da atividade antibacteriana no 6.º e 12.º dias, após à sementeira, utilizando o seguinte método: a 4 cc. de caldo simples adicionamos 1 cc. de meio de cultura em pesquisa e 1 gota de uma cultura de 12 horas de *Staphylococcus aureus* n.º 553 diluida a 1:20. Agitamos, fortemente, todos os tubos. Trabalhamos, assim, com a diluição de 1:5. A leitura era feita após 24 horas de permanência na estufa a 37º C. A ausência de turvação nos mostrava que a cultura era ativa; a leve turvação era índice de atividade parcial, que dividimos, comforme a maior ou menor turvação em dois grupos:

$++$ = leve turvação, próxima da atividade total;
$+$ = turvação mais acentuada, próxima da inatividade.

Não se deve considerar a ausência de atividade como resultado definitivo, porque trabalhamos, apenas, com um meio de cultura e um organismo teste (*Staphylococcus aureus* n.º 553). A pesquisa em outros meios e a utilização de outros germes poderão revelar atividade em amostras até agora inativas.

Observamos resultados discordantes em amostras da mesma espécie, o que talvez tenha explicação na proveniência das mesmas (*Aspergillus flavus, A. giganteus, A. nidulans, A. ochraceus, A. oryzae, A. profusus, A. repens, A. sydowi, A. tamarii, A. terreus, A. versicolor* e *A. wentii*). Contudo, não raramente, tôdas as amostras de uma mesma espécie se apresentaram inativas (*Aspergillus amstelodami, A. candidus, A. effusus, A. fumigatus, A. luchuensis,* e *A. niger*)

A discordância dos resultados apresentados nas primeiras e segundas dosagens se verifica em grande número de casos. Ora a atividade, presente na primeira dosagem se mostra diminuída ou mesmo ausente na segunda, ora verificamos, no 12.º dia, o aparecimento de atividade total, ou parcial, em amostras inteiramente inativas, até o 6.º dia. Daí, a necessidade de se prolongar o período de pesquisas, que devem ser feitas com intervalos menores.

CULTURAS

Todas as culturas estudadas, cujas fichas transcrevemos a seguir, pertencem à Secção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

Aspergillus amstelodami (MANGIN, 1909) — Cultura 232. Determinada por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 109. Cresce em sacarose a 13%. E' provavelmente, a cultura original de MANGIN.

A. amstelodami — Cultura 1.251. Determinada por O. DA FONSECA. Proveniência: isolada por O. DA FONSECA de um caso de micetoma de grãos amarelo-sulfúreos volumosos (mais de um milímetro de diâmetro), bosselados, resistentes, que a fresco, esmagados entre lamina e lamínula, em solução aquosa de potassa a 40.º C e aquecidos, mostravam além de filamentos micelianos, elementos filiformes reunidos em densas aglomerações flabeliformes e peniciladas.

A. candidus LINK, 1824 — Cultura 219. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 106.

A. candidus LINK, 1824 — Cultura 221. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, United States Department of Agriculture, Washington, D. C. (n.º 4.261).

A. carbonarius (BAINIER) THOM — Cultura 194. Det. por THOM — Proveniência: coleção de THOM, n.º 4.030. 1 Bull. Soc. Bot. Fr., págs. 29-30; Jl. Agr. Res. 7:12, 1916; Syn. S. carbonaria BAINIER.

A. cinnamomeus SCHIEMMANN, 1912 — Cultura 196. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, como um dos três mutantes obtidos por ELISABETH SCHIEMMANN, de *Aspergillus niger*. (Jl. Agr. Res. v. 6, n.º 1, páginas 1-15).

A. citrisporus VON HOHNEL, 1902 — Cultura 182. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, com o n.º 4186.10; recebido de THAXTER, que o isolou de excremento de crisálida.

A. disjunctus BAINIER, 1911 — Cultura 400. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, Paris. In Bull. Soc. Myc. de France. t. 27, pgs. 346-68 est. 10-11, 1911.

A. effusus — TIRABOSCHI, 1908 — Cultura 139. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 2.750.

A. effusus TIRABOSCHI, 1908 — Cultura 156. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 130.

A. effusus TIRABOSCHI, 1908 — Cultura 157. Det. por THOM e CHURCH. Proveniência: indiana; isolada de farinha de milho. In Sc. 171.

A. ficuum HENNINGS, 1895 — Cultura 191. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. Recebida de Amsterdam, com a nota "*A. ficuum* P. HENNINGS", n. 142; Hedwigia p. 80.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 25. Det. por O. DA FONSECA. Proveniência: Johns Hopkins Hospital, Baltimore. Isolada de otomicose, na clínica do prof. CROWE; material da doente Mrs. N. Segundo THOM, é um organismo do grupo *flavus*, mas não inteiramente idêntico a *A. flavus* típico.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 78. Det. por LASSEUR. Proveniência: amostra de SCHMITTER, com a nota: "338 *Aspergillus flavus*, Dr. LASSEUR, Nancy. VUILLEMIN Lab".

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 140. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 3557.9.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 141. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM., n.º 128 scl.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 142. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 2.773.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 143. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 108.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 145. Det. por WEHMER. Proveniência: Hannover.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 249. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, com a nota: "Quail", de caso de micose pulmonar desse animal. Na lista M. B. C.: "Quail, case of Aspergillosis." (Obs. Myc. pág. 14).

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 284. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, com o n.º 4.402.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 383. Det. por CHURCH. Proveniência. Sementeiras de latas de "pickles"; isolada por CHURCH. Tanto a cultura original, como o repique obtido para a coleção foram feitos em gelose simples, pelo que os aspectos característicos não aparecem; a sementeira do mesmo material em Czapeck-agar, porém, deu *A. flavus* típico. (Obs. Myc. p. 14).

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 473. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, Paris.

A. flavus LINK, 1791 — Cultura 1.250. Proveniência ignorada.

A. fumigatus FRESENIUS, 1841 — Cultura 63. Det. por THOM. Proveniência: amostra de THOM com a nota: 4.474.1H., sendo a mesma amostra descrita na Alemanha, com o nome de *A. cellulosae* por ANNA HOPFFE. (Cb. Bakt. Abt. I, Or., 83, pp. 531-7). (Beitrage z. Myk. Frankfurt, 1850-63)

A. fumigatus Fresenius, 1841 — Cultura 81. Det. por Vuillemin. Proveniência: amostra de Schmitter, com a nota: "339. *Aspergillus fumigatus*, Dr. Lasseur, Nancy, Vuillemin's Lab."

A. fumigatus Fresenius, 1841 — Cultura 225. Det. por Thom. Proveniência: United States Department of Agriculture, Washington, D. C.; isolada de couros; (n.º 4188.21).

A. fumigatus Fresenius, 1841 — Cultura 226. Det. por Thom. Proveniência: United States Department of Agriculture, Washington, D. C.; isolada de conservas de maçã; (n.º 4.190).

A. fumigatus Fresenius, 1841 — Cultura 227. Det. por Thom. Proveniência: Coleção de Thom, n.º 118. In Beitrage zur Mykol. Frankfurt 1850-63.

A. fumigatus Fresenius, 1841 — Cultura 228. Det. por Thom. Proveniência: Coleção de Thom, n.º 1460 e mais 4138. H. 52. Na lista M. B. C., com a nota: "(ascosporie) — soil." In Beitrage zur Mykologie Frankfurt, 1850-63).

A. fumigatus Fresenius, 1840 — Cultura 403. Det. por Fresenius. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. fumigatus Fresenius, 1840 — Cultura 1058. Det. por O. da Fonseca. Proveniência: Isolada de micose do saco aéreo de urubu. Observação do Dr. A. Lutz.

A. fumigatus Fresenius, 1840 — Cultura 1529. Det. por Jesuino Maciel. Proveniência isolada do pulmão de galinhola, por Jesuino Maciel, São Paulo.

A. fuscus Bonorden, 1861 — Cultura 197. Det. por Thom. Proveniência. Coleção de Thom. com o n.º 3534 c. como um dos três mutantes de Aspergillus niger, obtidos por Elisabeth Schiemann (Bot. Zeit. 1861, pp. 202).

A. giganteus Wehmer, 1907 — Cultura 695. Det. por Westerdijk. Proveniência: Centraalbureau voor schimmelcultures, Amsterdam.

A. giganteus Wehmer, 1907 — Cultura 1684. Det. por Thom. Proveniência: recebida do Instituto Bacteriológico de Buenos-Aires, com o número 49.

A. japonicus Saito, 1916 — Cultura 1687. Det. por Thom. Proveniência: recebida do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, com o n.º 52 e proveniente do Laboratório de Thom.

A. jeanselmei Ota, 1923 — Cultura 872. Det. por Ota. Proveniência: recebida de Ota com a nota: "pathogène, d'onychomycose".

A. luchuensis INUI, 1901 — Cultura 208. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. n.º 4291. 2. Coll. of. Science — Imperial Univ. Tokio. IV. 15. pp. 469-72, est. 22. fig. 1-8. Na lista M. B. C.: "*Aspergillus* Awamori Nakzawa — *A. luchuensis fide* THOM.

A. luchuensis INUI, 1901 — Cultura 209. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. 4291. 3. Coll. of Science Imperial Univ. Tokyo. V. 15. pág. 469-72. est. 22. fig. 1-8. Na lista M. B. C. as notas: "*Aspergillus* Awamori Nakzawa — *A. luchuensis fide* THOM.

A. luchuensis INUI, 1901 — Cultura 209. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. 4291. 3. Coll. of Science Imperial Univ. Tokyo. V. 15. pág. 469-72. est. 22. fig. 1-8. Na lista M. B. C. as notas: "*Aspergillus luchuensis* INUI — A. Awamori Nakazawa".

A. luchuensis INUI, 1901 — Cultura 210. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, rotulada: "*A luchuensis*. C. T., 11-12-1920". J. M. B. C. — *Aspergillus luchuensis*. Dust. Louisiana." (Coll. of. Science. Imperial Univ. Tokio. vol. 15. pág. 449-72, est. 22. fig. 1-8.)

A. malignus LINDT, 1889 — Cultura 131. Det. por VUILLEMIN. Proveniência: coleção de SCHMITTER, com o n.º 340.

A. mollis BAINIER e SARTORY, 1911 — Cultura 1685. Det. por THOM. Preveniência: Recebida do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, com o n.º 58. Procedente do Laboratório de THOM.

A. nidulans (EIDAM, 1883) — Cultura 76. Det. por LANGERON. Proveniência: amostra de SCHMITTER, com a nota: "398. *Sterigmatocystis nidulans* LANGERON, Paris Ok. wooly over but moph. good. C. T." (Cohns Beitr. z. Biol. d. Colan z. B. p. 337).

A. nidulans EIDAM, 1883 — Cultura 479. Proveniência: Faculté de Pharmacie, Paris.

A. nidulans EIDAM, 1883 — Cultura 1288. Proveniência: isolada de um caso suspeito de esporotricose 19.ª Enf. da Santa Casa (Rio). Caso 1720 do Laboratório de Clínica Dermatológica e Sifilográfica da Faculdade de Medicina. (O. DA FONSECA).

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 100. Det. por ARÊA LEÃO. Proveniência: isolada de otomicose; doente do Dr. LACORTE.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 129. Det. por LANGERON. Proveniência: coleção de SCHMITTER, com o n.º 403.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 190. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. Recebida em Setembro de 1909, de Amsterdam; n.º 111.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 193. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM com o n.º 2580. Segundo THOM, esta amostra corresponde em seus caracteres, a *A. pulverulentus*.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 198. Det. por THOM. Proveniência: Missouri, Estados Unidos da América.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 199. Dep. por THOM. Proveniência: coleção de THOM com o n.º 2.580, como isolado do interior de um Capsicum (rel pepper) vindo de Barcelona, Espanha.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 200. Det. por THOM. Proveniência: Delaware, Estados Unidos da América. (n.º 4269.4).

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 201. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM n.º 2774; recebida de D. Stout; isolada de otomicose.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 202. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 2766, isolada de material fermentado, constituído por galhas de carvalho, proveniente da China.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 203. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 3528. 7. Recebida do Mellon Inst. Pittsburgh; enviada por Mc. Dermott.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867. Cultura 204. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 4049. Obtido no Bureau of Chemistry; isolada de pasta de sardinhas.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 205. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 4020. 33. isolada do solo, em Texas.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 206. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 4030. 5. Recebida de Blakeslee, Storrs, Connecticut. Na lista M. B. C. o nome da espécie está com interrogação.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 207. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 4047. Referências in J. Agr. Res. 7; n. 1:3. Na lista M. B. C. fig. 2 com o mesmo n.º e proveniência diferente; um de suco de limão e outro de pasta de sardinha; este último crescendo em baixo de solo.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 301. Det. por ARÊA LEÃO. Proveniência: isolada de otomicose, eczema pruriginoso antigo do ouvido, com secreção soro-purulenta e às vezes escura.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 398. Det. por BAINIER e SARTORY. Proveniência: Faculté de Pharmarcie, Paris (Bull. Soc. Myc. 27. pág. 98).

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 477. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 480. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 481. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 482. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 484. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 485. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 933. Det. por O. DA FONSECA. Preveniência: isolada de otomicose, por Dr. JESUINO MACIEL, São Paulo.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 940. Det. por ARÊA LEÃO. Proveniência: isolada de otomicose; material proveniente da clínica de Dr. SANSON e enviado por Dr. JULIO MUNIZ.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 993. Det. por THOM. Proveniência: recebida de Dr. OSWALDO CRUZ FILHO, que a recebeu de THOM com o n.º 215.3528. 7

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 994. Det. por THOM. Proveniência: fornecida pelo Dr OSWALDO CRUZ FILHO, que a recebeu de THOM com o n.º 244.4707-878 e figura nos tratados como amostra 67.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1016. Preveniência ignorada.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1111. Det. por ARÊA LEÃO. Proveniência: isolada de otomicose.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1132. Preveniência ignorada.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1220. Det. por O. DA FONSECA. Proveniência: isolada por O. DE FONSECA de otomicose.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1484. Det. por O. DA FONSECA. Proveniência: isolada de otomicose.

A. niger VAN TIEGHEM, 1867 — Cultura 1548. Proveniência: isolada de otomicose.

A. novus WEHMER — Cultura 1.688. Det. por THOM. Proveniência: Recebida do Instituto Bacteriológico de Buenos Aires com o n.º 67. Procedente do Laboratório de THOM.

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 22. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, U. S. D. A. (n.º 4020.24).

A. niger (*var. altipes*) — Cultura 195. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, como um dos três mutantes obtidos por ELISABETH SCHIEMANN, numerado 3534 a.

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 223. Det. por THOM. Proveniência: United States Department of Agriculture. Isolado de Secale cereale (n.º 4117-112).

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 224. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM. United States Department of Agriculture, (número 4138. N. 43).

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 471. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 476. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. ochraceus WILHELM, 1877 — Cultura 483. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 146. Det. por THOM. Proveniência: Coleção de THOM, n.º 113.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 147. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. Z.) Proveniência: coleção de THOM.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 148. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. F.) Proveniência: coleção de THOM.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 149. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. H.) Proveniência: coleção de THOM.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 150. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. G.) Proveniência: coleção de THOM.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 152. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. D.) Proveniência: Japão.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 153. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. A.) Proveniência: Japão. Isolada de *tane-koji*, de fábrica de saké, bebida fermentada de arroz.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 154. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. N.) — Proveniência: Isolada de tamari-koji. — Japão.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 155. Det. por T. TAKAHASHI (Taka. P.) Proveniência: Noda, Japão. Isolada de *shoyu-koji*.

A. oryzae COHN, 1884 — Cultura 176. Det. por THOM. Proveniência: United States Department of Agriculture, (n.º 4235. I.-5) coleção de THOM.

A. parasiticus SPEARE, 1912 — Cultura 138. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM n.º 3509.

A. parasiticus SPEARE, 1912 — Cultura 1686. Det. por THOM. Proveniência: Instituto Bacteriológico de Buenos Aires, com o n.º 78 e proveniente do Laboratório de THOM.

A. profusus BAINIER — Cultura 405. Det. por BAINIER. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. profusus BAINIER — Cultura 1689. Det. por THOM. Proveniência: Instituto Bacteriológico de Buenos-Aires, com o n.º 79 e proveniente do Laboratório de THOM.

A. repandus — Cultura 1710. Det. por NEGRONI. Proveniência: recebida do Instituto Bacteriológico de Buenos-Aires, com o n.º 80.

A. repens (CORDA) SACCARDO — Cultura 404. Det. por BAINIER e SARTORY. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París. (V. Bull. Soc. Mycol., tomo 27, p. 453-7, est. 16) (grupo glaucus).

A. repens (CORDA) SACCARDO — Cultura 406. Det. por SACCARDO. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París. (Mich. II, pp. 557).

A. repens (CORDA) SACCARDO — Cultura 407. Det. por BAINIER e SARTORY. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París. (Bull. Soc. Myc. Fr. t. 28, 1912, pp. 257-62, est. X.) grupo glaucus.

A. repens (CORDA) SACCARDO — Cultura 408. Det. por BAINIER e SARTORY. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París. (Bull. Soc. Myc. Fr. t. 28, p. 267.) (B. S. M. Fr. T. 28, pp. 267-9, est. 12).

A. sulphureus (FRESENIUS) THOM e CHURCH — Cultura 1683. Det. por THOM. Proveniência: Instituto Bacteriológico de Buenos-Aires, com o n.º 99 e proveniente do Laboratório de THOM.

A. sydowi BAINIER e SARTORY, 1913 — Cultura 113. Det. por THOM. Proveniência: coleção de THOM, n.º 4052. Ann. Myc. II, lp. 25-9, Pi.III).

A. sydowi BAINIER e SARTORY, 1913 — Cultura 158. Det. por THOM. e M. B. CHURCH. Proveniência: United States Departament Agriculture, Washington, D. C. (n.º 3521).

A. sydowi BAINIER e SARTORY, 1913 — Cultura 159. Det. por THOM. e M. B. CHURCH. Proveniência: United States Department of Agriculture, Washington, D. C. (n.º 4.125.1).

A. sydowi Bainier e Sartory, 1913 — Cultura 160. Det. por Thom. e M. B. Church. Proveniência: United States Department of Agriculture, Washington, D. C. n.º 4235.I-7.

A. sydowi Bainier e Sartory, 1913 — Cultura 164. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, com a nota "Rop. 22".

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 178. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., Col. de Thom. n.º 3565.

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 179. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom. n.º 4010.2.

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 180. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom. n.º 4070.

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 184. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom., n.º 4227.

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 186. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, n.º 4235. I-2.

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 187. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom., n.º 4417.3 e a nota: "purple scl."

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 188. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, com a nota: "S. 3 Asp.".

A. tamarii Kita, 1913 — Cultura 397. Det. por Bainier. Proveniência: Espéce (souche originale) isolée par Bainier, non décrite. Faculté de Pharmacie, París.

A. terreus Thom, 1916 — Cultura 216. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom n.º 144. Na lista M. B. C.: "soil".

A. terreus Thom, 1916 — Cultura 217. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A. Isolada do tubo intestinal do homem (n.º 4010.1).

A. terricola Marchal, 1893 — Cultura 189. Det. por Tmom. Proveniência: coleção de Thom, var. americana.

A. ustus Bainier — Cultura 488. Proveniência: Faculté de Pharmacie, París.

A. verrucolosum Vuillemin, 1918 — Cultura 1462. Proveniência: Negroni, Buenos-Aires, com o n.º 297.

A. versicolor (Vuillemin) Tiraboschi, 1908 — Cultura 112. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom n.º 4483.

A. versicolor (Vuillemin) Tiraboschi, 1908 — Cultura 135. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, n.º 2735.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 137. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, n.º 3555.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 165. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom com a nota: "4063 Asp".

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 166. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom, n.º 4235 I-4.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 167. Det. por Vuillemin. Proveniência: Thom e M. B. Church, n.º 4235. II-3.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 168. Det. por Thom e M. B. Church, (n.º 4202. 4c.) Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom; isolada de plantas secas vindas da China.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 169. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A. Coleção de Thom, isolada do solo número 4063. B-7.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 170. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom, n.º 4291.14.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 171. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A. Coleção de Thom., isolada de romã. número 4069.3.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 172. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A. coleção de Thom., isolada do solo.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 173. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom, n.º 4235. I-3.

A. versicolor (Vuillemin) Taraboschi, 1908 — Cultura 175. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., (Zebbar's n.º 18.).

A. violaceofuscus Gasperini, 1887 — Cultura 192. Det. por Thom. Proveniência: Pôrto Rico, isolada do solo. (n.º 3522.30).

A. wentii Wehmer, 1896 — Cultura 177. Det. por Thom. Proveniência: U. S. D. A., coleção de Thom, n.º 116.

A. wentii Wehmer, 1896 — Cultura 181. Det. por Thom. Proveniência: isolada por Thaxter do solo do Oregon. (n.º 4078. Or.-5).

A. wentii Wehmer, 1896 — Cultura 183. Det. por Thom. Proveniência: coleção de Thom, n.º 4186. 34.

A. wentii Wehmer, 1896 — Cultura 185. Det. por Thom. Proveniência: Brasil, isolada de castanhas do Pará. (n.º 4230).

Aspergillus sp. — Cultura 151. Proveniência: isolada de secreção da aurícula direita da doente M. A., da Policlínica de Botafogo (Rio). Material enviado por Dr. José Melman.

Aspergillus sp. — Cultura 212. Proveniência: coleção de Thom, número 4.287.20, recebida de Dr. Thaxter. Na lista M. B. C.: "Thaxter n.º 20 *Aspergillus*".

Aspergillus sp. — Cultura 213. Proveniência: coleção de Thom, número 4.339; isolada como contaminação de culturas vindas do Japão. Na lista M. B. C.: "In Takahashi's T, Japan".

Aspergillus sp. — Cultura 214. Proveniência: coleção de Thom, número 4.186.1; riquissimo em ascoscarpos; proveniente da China.

Aspergillus sp. — Cultura 215. Proveniência: coleção de Thom, número 4.079. S. 2, isolada de latas de sardinha.

Aspergillus sp. — (*aff. terreus*) — Cultura n. 218. Proveniência: U. S. Department of Agriculture, Washington D. C. Na coleção de Thom e Church, com o n.º 4.138. Q-13.

Aspergillus sp. — Cultura 229. Preveniência: isolada de secreção do ouvido esquerdo da doente P. C. S. da Policlínica de Botafogo (Rio). Material enviado por Dr. José Melman.

Aspergillus sp. — Cultura 230. Preveniência: isolada de secreção do ouvido direito da doente O. C. da Policínica de Botafogo (Rio). Material enviado por Dr. José Melman.

Aspergillus sp. — Cultura 233. Proveniência: coleção de Thom, número 4086. Grupo *glaucus repens*. Na lista M. B. C.: "(109-134 group) — Noldy peannts."

Aspergillus sp. — Cultura 234. Proveniência: coleção de Thom, número 3556. Na lista M. B. C.: "accidental."

Aspergillus sp. — Cultura 235. Proveniência: coleção de Thom, número 4125.2. Na lista M. B. C.: "(109-134 group) — Dred navy beans".

Aspergillus sp. — Cultura 236. Proveniência: coleção de Thom, número 134. Na lista M. B. C., vem como *Aspergillus glaucus* group.

Aspergillus sp. — Cultura 237. Proveniência: coleção de Thom, número 126. Na lista M. B. C., com a nota: "gelatine writing tablet". Amostro typo *glaucus-repens*.

Aspergillus sp. — Cultura 239. Proveniência: coleção de Thom, número 4118.3. Na lista M. B. C.: (109-134 Group) Comercial water "Amostra do typo *glaucus-repens*".

Aspergillus sp. — Cultura 240. Proveniência: coleção de THOM, número 4125.3. Amostra do typo *glaucus-repens.*

Aspergillus sp. — Cultura 241. Proveniência: coleção de THOM, número 4167. Na lista M. B. C. "(109-126 — 134 group) Paper over grape jelly." Amostra do typo glaucus-repens.

Aspergillus sp. — Cultura 242. Proveniência: coleção de THOM, número 4193. Na lista M. B. C. "(109-134 group) — Fig. paste" Amostra do typo glaucus repens.

Aspergillus sp. — Cultura 243. Proveniência: coleção de THOM, número 4194. Na lista M. B. C.: "(109-134 group — jelly geen, tomato)." Amostra do typo *glaucus-repens.*

Aspergillus sp. — Cultura 244. Proveniência: coleção de THOM, número 4291.1. Amostra do typo *glaucus-repens.*

Aspergillus sp. — Cultura 247. Proveniência: coleção de THOM, número 2713, aff. do n.º 4303.60.

Aspergillus sp. — Cultura 248. Proveniência: coleção de THOM, número 4303.60 aff. do n.º 2713 group.

Aspergillus sp. — Cultura 297. Proveniência: coleção de THOM, número 4481; isolada de figos da Califórnia. E' representante provavel do grupo *glaucus-repens,* talvez idêntico ao *A. verruculosum* de VUILLEMIN ou à var. major de *A. herbariorum* ou *A. repens* de MANGIN.

Aspergillus sp. — Cultura 533. Proveniência: contaminaya culturas de *Allescheria boydii* vindas do laboratório de Shear (O. DA FONSECA).

Aspergillus sp. — Cultura 561. Proveniência: ignorada.

Asperdillus sp. — Cultura 786. Proveniência: isolada da boca, caso de sapinho de adulto, París. (O. DA FONSECA).

Asperdillus sp. — Cultura 977. Proveniência: Lyon. Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Medicina. Dr. G. MASSIA. Representante provável do grupo *flavus.*

Aspergillus sp. — Cultura 1070. Proveniência: Isolada de otomicose, por Dr. RIETMANN, Strasbourg.

Aspergillus sp. — Cultura 1165. Proveniência: Contaminação de laboratório associada a Penicillium e produzindo ascosporos numerosos.

Aspergillus sp. — Cultura 1167. Proveniência: Contaminação de laboratório. Forma peritecios.

Aspergillus — Cultura 1202. Proveniência: isolada de um nódulo de piedra negra.

Aspergillus sp. — Cultura 1203. Proveniência: Contaminação de solução aquosa a 5% de cloreto de amônio.

Aspergillus sp. — Cultura 1290. Proveniência: Laboratório Samper Martinez. Instituto Nacional de Higiene de Bogotá. Colômbia; isolada de variedade violeta de caratés em Março de 1929. N. S. 24.

Aspergillus sp. — Cultura 1485. Proveniência: Laboratório da 26.ª Enfermaria da Santa Casa (Rio) em uma caixa de couro. (9-6-930) Dr. S. FIQUENE.

Aspergillus sp. — Cultura 1624. Proveniência: isolada do tubo digestivo de peixe elétrico de água doce (O. DA FONSECA).

Aspergillus sp. — (*grupo flavus*) — Cultura 1625. Proveniência: isolada do tubo digestivo de peixe elétrico de água doce (O. DA FONSECA).

Aspergillus sp. — Cultura 1626. Proveniência: isolada do tubo digestivo de peixe elétrico de água doce, (O. DA FONSECA).

Aspergillus sp. — Cultura 1633. Proveniência: isolada de pena de pombo, em 31-10-1933 (O. DE FONSECA).

Aspergillus sp. — Cultura 1816. Proveniência: Contaminação de cultura de *Fusarium*.

RESULTADOS

O quadro anexo apresenta os resultados detalhados dos nossos estudos. Relacionamos as amostras de acôrdo com as atividades apresentadas no 6.º e 12.º dias.

DIAS		ESPÉCIES	TOTAL
6.º	12.º		
+	+	*Aspergillus* — Culturas n.º 78, 140, 145, 249, 383 e 1.250 *A. ochraceus* — Cultura n.º 223 *A. sp.* — Cultura n.º 1.633	8
+	± ±	*A. sp.* (grupo flavus) — Cultura n.º 1.625	1
+	±	*A. sp.* — Culturas n.º 237, 977, 1.070 *A. tamarii* — Cultura n.o 396	4
+	—	*A. jeanselmei* — Cultura n.º 872 *A. nidulans* — Cultura n.º 479 *A. sydowi* — Cultura n.º 158 *A. sp.* — Culturas n.º 213, 244, 247 e 561	7

DIAS		ESPÉCIES	TOTAL
6.º	12.º		
± ±	+	*A. oryzae* — Cultura n.º 176 *A. repens* — Cultura n.º 408 *A. sp.* — Cultura n.º 235	3
± +	± ±	*A. sydowi* — Cultura n.º 164	1
± ±	±	*A. ochraceus* — Cultura n.º 471 *A. sp.* — Cultura n.o 240	2
+	—	*A. ochraceus* — Cultura n.º 483 *A. parasiticus* — Culturas n.º 138 e 1.686 *A. sp.* — Culturas n.º 241, 786 e 1.485	6
±	±	*A. flavus* — Cultura n.º 141 *A. oryzae* — Cultura n.º 147 *A. versicolor* — Cultura n.º 168 *A. sp.* — Cultura n.º 239	4
±	—	*A. flavus* — Culturas n.º 25 284 e 473 *A. ochraceus* — Cultura n.º 222 *A. sp.* — Culturas n.º 212, 236, 533, 1.203 e 1.624..... *A. versicolor* — Cultura n.º 170	10
—	+	*A. giganteus* — Cultura n.º 1.684 *A. ochraceus* — Cultura n.º 476	2
—	± +	*A. repens* — Cultura nº. 406	1
—	±	*A. oryzae* — Cultura nº. 150 *A. profusus* — Cultura nº. 1.689 *A. tamarii* — Culturas nº. 178 e 187 *A. terreus* — Cultura nº. 217 *A. verruculosum* — Cultura nº. 1.462 *A. versicolor* — Cultura nº. 137 *A. wentii* — Cultura nº. 177	8
—		*A. amstelodami* — Culturas n.º 232. 1.251 *A. candidus* — Culturas n.º 219, 221 *A. carbonarius* — Cultura n.º 194 *A. cinnamomeus* — Cultura n.º 196 *A. citrisporus* — Cultura n.º 182 *A. disjunctus* — Cultura n.º 1.400 *A. effusus* — Culturas n.º 139, 156 e 157 *A. ficuum* — Cultura n.º 191 *A. flavus* — Culturas n.º 142 e 143 *A. fumigatus* — Culturas n.º 63, 81, 225, 226, 227, 228. 403, 1.058 e 1.529	

DIAS		ESPÉCIES	TOTAL
6.º	12.º		
—	—	*A. fuscus* — Cultura n.º 197 *A. giganteus* — Cultura n.º 695 *A. japonicus* — Cultura n.º 1.687 *A. luchuensis* — Culturas n.º 208, 209 e 210 *A. malignus* — Cultura n.º 131 *A. mollis* — Cultura n.º 1.685 *A. nidulans* — Culturas n.º 76 e 1.288 *A. niger* — Culturas n.º 100, 129, 190, 193, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 301, 398, 477, 480, 481, 482, 484, 485, 933, 940, 993, 994, 1.016, 1.111, 1.132, 1.220, 1.484, 1.548 *A. niger* (var. altipes) — Cultura n.º 95 *A. novus* — Cultura n.º 1.688 *A. ochraceus* — Cultura n.º 224 *A. oryzae* — Culturas n.º 146, 148, 149, 152, 153, 154 e 155 *A. profusus* — Cultura n.º 405 *A. repandus* — Cultura n.º 1.710 *A. repens* — Culturas n.º 404 e 407. *A. sp.* (aff. terreus) — Cultura n.º 218 *A. sp.* — Culturas n.º 151, 214, 215, 229, 230, 233, 234, 242, 243, 248, 297, 1.165, 1.167, 1.202, 1.290, 1.626, 1.815 *A. sulphureus* — Cultura n.º 1.683 *A. sydowi* — Culturas n.º 113, 159 e 160 *A. tamarii* — Culturas n.º 179, 180, 184, 186 e 188 *A. terreus* — Cultura n.º 216 *A. terricola* — Cultura n.º 189 *A. ustus* — Cultura n.º 488 *A. versicolor* — Culturas n.º 112, 135, 165, 166, 167, 169, 171 172, 173 e 175 *A. violaceo-fuscus* — Cultura n.º 192 *A. wentii* — Culturas n.º 181, 183 e 185	123

Conclusões

I — Pesquisamos a atividade antibacteriana de tôdas as amostras (180) do gênero *Aspergillus* na Secção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz.

II — Os resultados obtidos foram os seguintes:

25 amostras apresentaram atividade total na primeira ou segunda dosagem;

32 amostras apresentaram atividade parcial na primeira ou segunda dosagem.

123 amostras mostraram-se negativas em ambas as dosagens.

III — Os resultados negativos não devem ser considerados como definitivos, porque trabalhamos, apenas, com um meio de cultura e com um organismo teste (*Staphylococcus aureus* n.º 553).

IV — Observamos, por vezes, discordâncias de resultados entre amostras diversas da mesma espécie, fato talvez explicável pela diversidade de suas proveniências.

V — A frequente discordância de resultados da mesma amostra nas duas dosagens indica a necessidade de se prolongar, sistemàticamente, o período de pesquisas, que devem ser feitas com intervalos menores.

Este trabalho foi realizado na Secção de Micologia do Instituto Oswaldo Cruz, sob a chefia do Professor Dr. A. E. Arêa Leão, ao qual deixamos aqui consignados nossos agradecimentos, pela orientação segura que nos deu na realização deste trabalho, bem como às senhoritas Maria Deusdedit Araujo Fraga e Creusa Dantas da Silva, estudantes de medicina pela prestimosa colaboração que nos prestaram.

Conclusions

The author studied the antibacterial activity of all of the strains (180) of the genus *Aspergillus* maintained by the Section of Mycology of the Instituto Oswaldo Cruz.

The following results were obtained:

a) Twenty five strains showed total activity in the first or second assay;

b) Thirty two strains showed partial activity in the first or second assay;

c) One hundred and twenty three showed no activity in either assay.

The negative results shoult not be considered definite because only one culture medium and a single test organism (*Staphylococcus aureus* n.° 553) were used.

At times, we observed discrepancies in the results obtained with different strains of the same species. This may be explained by the fact that these strains of a single species were obtained from many different places.

The frequency of discrepancies in the results obtained with a single strain, in two assays, indicates the necessity of prolonging systematicaliy the period of study at shorter intervals.

Eliminação urinaria do cloreto de sodio na anemia ancilostomotica (*) 1

por

W. O. Cruz e R. Pimenta de Mello

No decurso de experiências sôbre novos métodos de profilaxia da anemia na ancilostomose, tivemos ocasião de observar a eliminação diária de cloreto de sódio na urina, durante largo período de tempo. Apesar de ser um elemento de pesquisa rotineira, não existem na literatura, senão escassas informações neste assunto. TEIXEIRA (1) (Tabela 1) apresenta dados colhidos em 14 casos, oito determinações em cada doente, 4 antes e 4 depois de tratamento por vermífugos, possìvelmente associados a sais de ferro. Nas anemias em geral o cloreto de sódio urinário tem obtido pouca atenção dos autores. MAJOR (2) (Tabela 2) relatou retenção de cloretos em 3 casos de anemia perniciosa, e CHRISTIAN (3) (Tabela 3), em 14 casos de anemia perniciosa. Tôdas essas observações foram feitas quando não se conhecia a origem marcadamente carencial da anemia de BIERMER e da anemia ancilostomótica, e assim impossível fôra observar os fenômenos de normalização no mecanismo excretor do cloreto de sódio, após tratamento adequado.

Métodos:

Os doentes eram observados preliminarmente em um período contrôle, sob a mesma alimentação mantida durante o transcurso da prova. Consistia de arroz, feijão, carne, legumes, pão e leite, tipo de alimentação habitual no hospital em que trabalhamos. Mesmo antes dos 4 dias que constituíram o período contrôle, já os doentes assim se alimentaram cêrca de uma a duas semanas. Insistimos nesse ponto, para acentuar que o regime alimentar em nada concorreu nos fenômenos descritos neste trabalho. O tratamento constou de administração de diferentes sais de ferro, *sem* aplicação de vermífugos.

(*) Trabalho da Seção de Hematologia auxiliada por benemerência do Dr. Guilherme Guinle.

(1) Recebido para bublicação a 15 de julho e dado à publicidade em outubro de 1944.

Dosagens de cloreto de sódio na urina foram executadas pelo método de MÖHR, que emprega titulação pelo nitrato de prato N/10, utilizando como indicador uma solução de cromato amarelo de potássio a 10%.

Resultados:

Em seis casos verificados, dois dêles apresentaram eliminação abaixo de 8 g por 1.000 cm3 de urina. TEIXEIRA (1) relata sete dêsses casos nas suas observações. Assim, *grosso modo*, cêrca de metade dos casos de anemia ancilostomótica apresentam uma acentuada baixa de cloreto da urina.

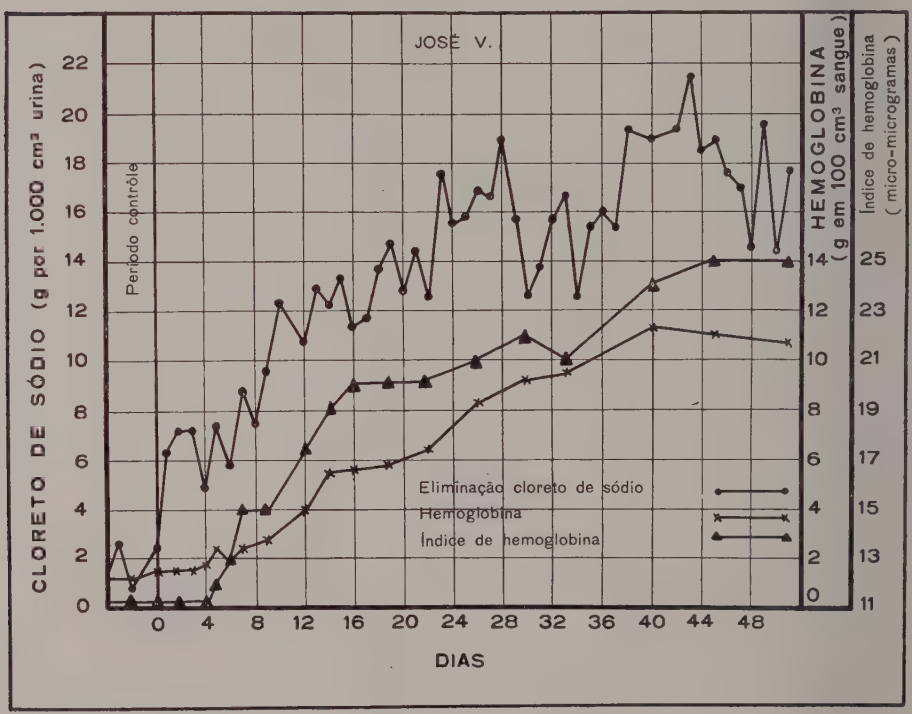

JOSÉ V.
CLORETO DE SÓDIO (g por 1.000 cm³ urina)
HEMOGLOBINA (g em 100 cm³ sangue)
Índice de hemoglobina (micro-microgramas)
Período contrôle
Eliminação cloreto de sódio
Hemoglobina
Índice de hemoglobina
DIAS
0 4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22
11 13 15 17 19 21 23 25

GRÁFICO 1

Tal como o edema na ancilostomose, a diminuição de cloreto na urina não tem correlação com o grau de anemia. Observamos casos com 2.50g de hemoglobina em 100 cm3 de sangue, e 10.0 g cloreto de sódio excretado; com 1.65 g de hemoglobina e 2.6 g cloreto; e 2.75 g hemoglobina e 14.7 g clo-

reto. Entretanto só em anemias acentuadas se observam grandes edemas ou apreciável retenção de cloreto.

Os casos por nós observados encontram-se na tabela 4. O gráfico 1 mostra a estreita relação entre a regeneração hemática e a normalização do fenomeno aqui apresentado. Após 23 dias de medicação marcial foi completa

TABELA 1

ELIMINAÇÃO URINÁRIA DE CLORETO DE SÓDIO NA ANCILOSTOMOSE, segundo TEIXEIRA (1)

CASOS	HEMOGLOBINA Por cento (Sahli)		CLORETO DE SÓDIO (g por 1.000 cm³ de urina) (Média de 4 determinações)	
	Antes do tratamento	Depois do tratamento	Antes do tratamento	Depois do tratamento
1	14	—	4.9	—
3	29	—	9.5	—
6	16	—	5.0	—
7	29	70	12.6	16.0
8	16	74	5.5	15.7
9	15	66	9.6	9.5
10	28	57	9.2	11.6
11	45	75	7.7	11.5
12	21	75	7.7	15.2
13	34	—	6.7	9.3
14	45	—	7.0	9.4

TABELA 2

ELIMINAÇÃO URINÁRIA DE CLORETO DE SÓDIO NA ANEMIA PERNICIOSA, segundo MAJOR (2)

CASOS	HEMOGLOBINA % (Método gasométrico)	CLORETO DE SÓDIO (g por dia)	CLORETO DE SÓDIO (Após ingestão de 6 a 10 g de cloreto de sódio) (Média de várias determinações)
L.H.	28	1.7	0.9
E.F.	62	1.4	1.1
T.E.	46	0.6	2.3

a normalização da taxa de cloreto de sódio na urina. No gráfico 2 obtivemos retôrno ao normal no curto prazo de 8 dias, e no gráfico 3, em cêrca de 12 dias, gráfico 4 mostra que os fenomenos de regeneração hemática não ocasio-

nam, por si, aumento de excreção de cloreto de sódio na urina, pois nêstes doentes, que apresentavam antes da medicação taxas quase normais, as conservaram neste mesmo nível durante todo o período regenerativo. As fotos 1, 2 e 3 mostram claramente que os doentes nos quais observamos as mais baixas taxas de retenção de cloretos, não apresentavam edema digno de nota.

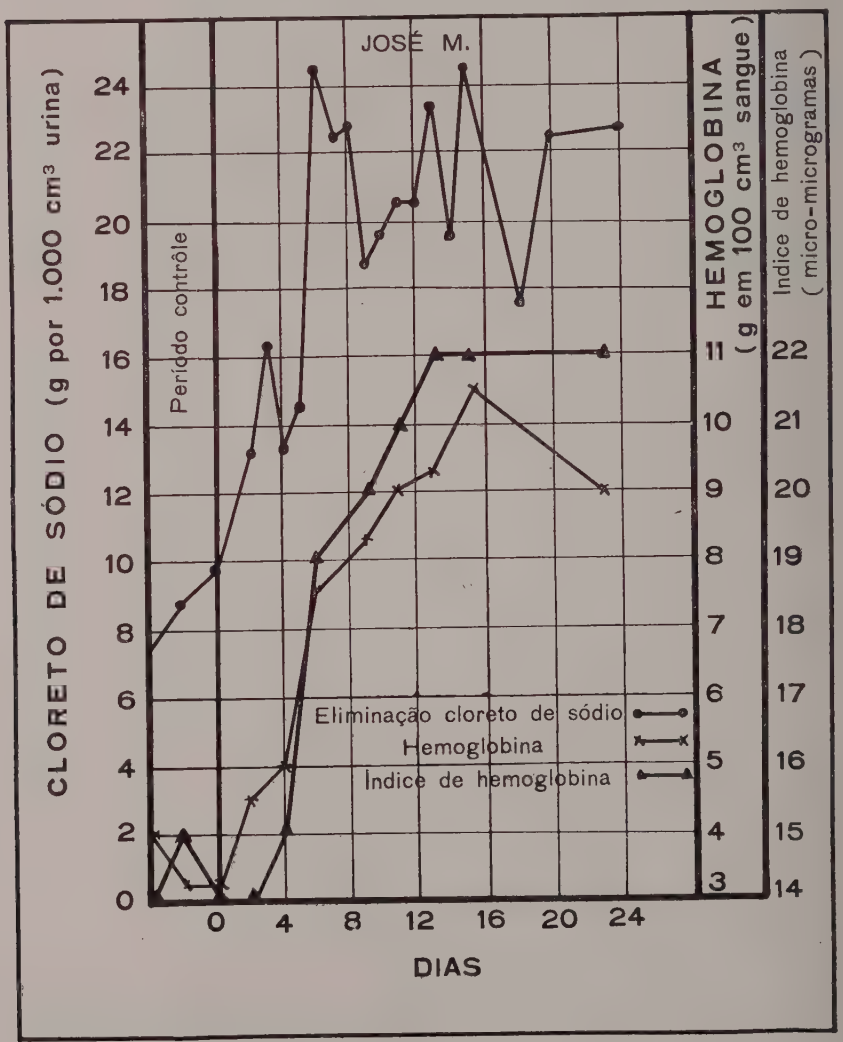

JOSÉ M.
CLORETO DE SÓDIO (g por 1.000 cm³ urina)
HEMOGLOBINA (g em 100 cm³ sangue)
Indice de hemoglobina (micro-microgramas)
Período contrôle
Eliminação cloreto de sódio
Hemoglobina
Indice de hemoglobina
DIAS
0 4 8 12 16 20 24
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
3 4 5 6 7 8 9 10 11
14 15 16 17 18 19 20 21 22

GRÁFICO 2

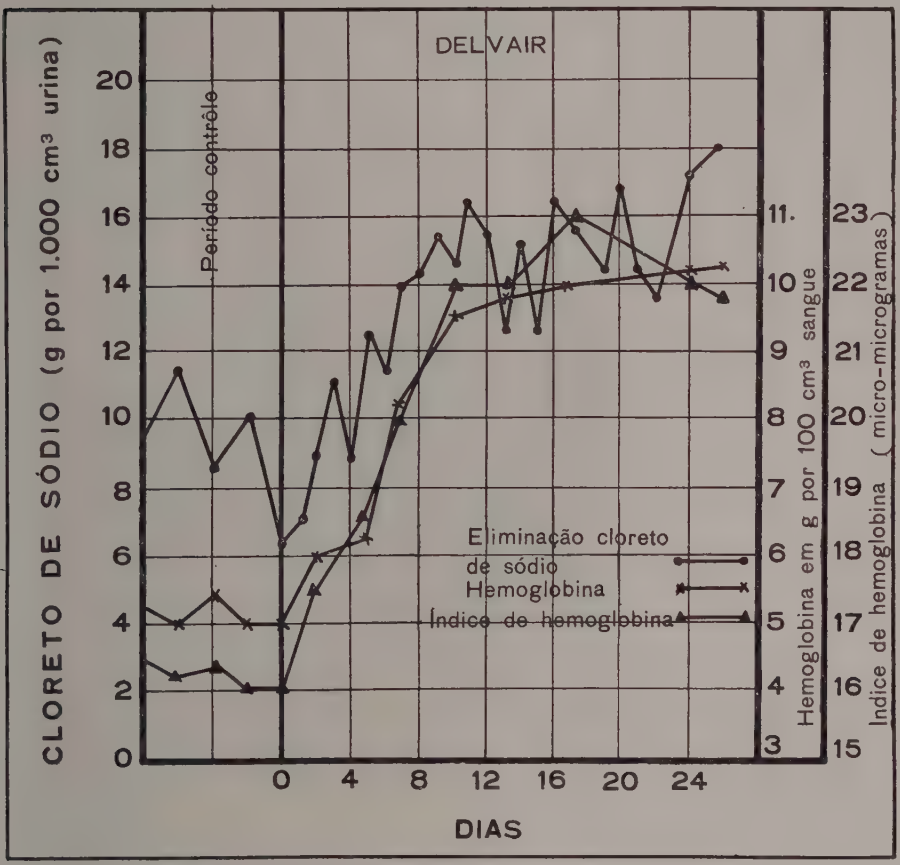

DELVAIR
Período contrôle
CLORETO DE SÓDIO (g por 1.000 cm³ urina)
Hemoglobina em g por 100 cm³ sangue
Indice de hemoglobina (micro-microgramas)
Eliminação cloreto de sódio
Hemoglobina
Índice de hemoglobina
DIAS
0 4 8 12 16 20 24
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20
3 4 5 6 7 8 9 10 11.
15 16 17 18 19 20 21 22 23

GRÁFICO 3

TABELA 3

ELIMINAÇÃO URINÁRIA DE CLORETO DE SÓDIO NA ANEMIA PERNICIOSA, segundo CHRISTIAN(3)

CASOS	HEMOGLOBINA	CLORETO DE SÓDIO (g por 1.000 cm³) Determinação em um só dia	CLORETO DE SÓDIO (g por dia) Determinação em um só dia
1	12	2.6	3.1
2	42	9.9	9.9
3	37	3.2	4.7
4	52	3.5	2.4
5	30	3.9	1.8
6	26	3.3	2.5
7	45	6.7	5.2
8	35	8.7	9.0
9	29	5.9	7.9
10	35	4.8	3.5
11	28	2.8	2.9
12	34	1.8	2.0
13	19	1.4	1.5
14	78	4.8	7.8

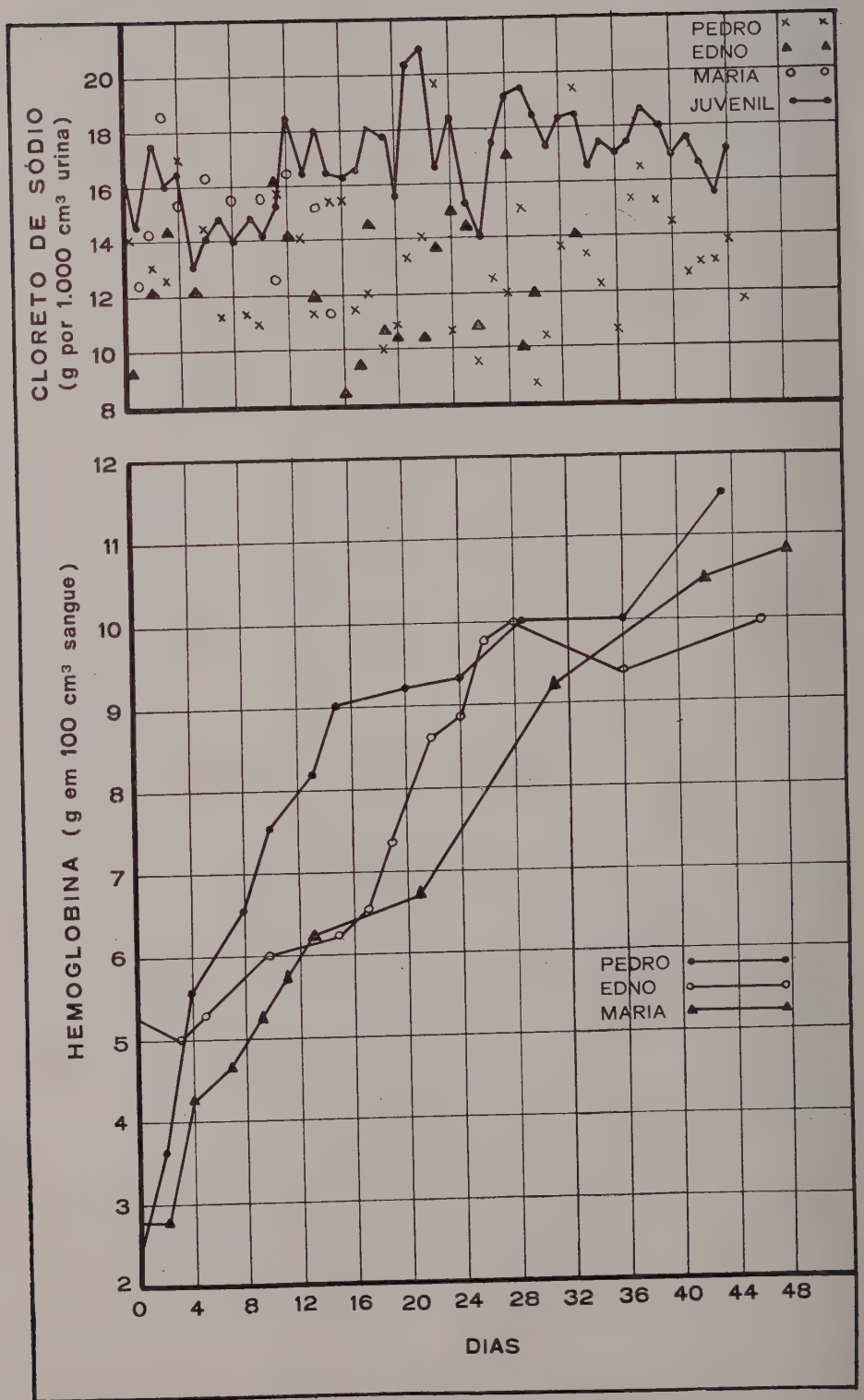

CLORETO DE SÓDIO
(g por 1.000 cm³ urina)
PEDRO
EDNO
MARIA
JUVENIL
HEMOGLOBINA (g em 100 cm³ sangue)
PEDRO
EDNO
MARIA
DIAS

GRÁFICO 4

TABELA 4

ELIMINAÇÃO URINÁRIA DE CLORETO DE SÓDIO NA ANCILOSTOMOSE, ANTES E DEPOIS DA ADMINISTRAÇÃO DE FERRO, SEM ELIMINAÇÃO DOS HELMINTOS PARASITOS

CASOS	HEMOGLOBINA (g por 100 cm³ de sangue)		CLORETO DE SÓDIO (gr) (Média de 5 determinações)			
			Por 1.000 cm³ de urina		Por dia	
	Antes do tratamento	Depois do tratamento	Antes do tratamento	Depois do tratamento	Antes do tratamento	Depois do tratamento
Pedro	2.50	11.25	10.1	15.6	13.7	13.2
José V.	1.65	11.00	2.6	14.2	4.4	15.6
Delvair	5.25	10.50	9.2	15.1	7.6	12.4
José M.	4.00	10.25	7.7	19.7	5.3	13.7
Edno	5.25	10.00	12.3	12.7	12.5	12.9
Maria	2.75	10.75	14.7	15.3	6.3	10.5
Juvenil (normal)	10.50	—	16.3	—	15.6	—

Discussão :

Não nos parece possível interpretar devidamente a baixa eliminação de cloreto de sódio aqui descrita em casos de anemia ancilostomótica. Numa doença em que podem existir perturbações funcionais do rim, um estado mais ou menos grave de insuficiência cardíaca, edemas acentuados, sintomas êstes superpostos a um quadro de hipofunção orgânica geral, decorrente da anemia, nos parece impossível aventar qualquer hipótese na disfunção do metabolismo de um electrolito tão ligado à economia de todo o organismo. Para isso, seria necessário um detalhado estudo, de per si, de cada uma das funções orgânicas relacionadas, direta ou indiretamente, com a função do sódio no organismo.

Para um unico ponto queremos chamar a atenção. O aparecimento de fenomenos não característicos como o edema, eliminação baixa de cloretos, insuficiência cardíaca acentuada, degenerações do epitélio renal, pode estar relacionado com um fator a que se tem dado pouca atenção e que muito pode contribuir na explicação da inconstância dêstes sintomas. Quer nos parecer de importância o período de tempo em que foi o organismo doente submetido ao regime de insuficiência provocado por um nível baixo de hemoglobina. Êste dado, que infelizmente só pode ser obtido em condições experimentais, tem seguramente grande significação para os processos orgânicos, possivelmente tanta importância quanto o próprio teor de hemoglobina circulante.

A anemia, em muitos casos, se processa lentamente e o organismo vai se adaptando a essas novas condições, estabelecendo-se assim um regime de equilíbrio fisiológico. Da mesma maneira que lesões de igual extensão nas

Foto 1 — *José M.* Hb = 4.60 gr 100 cm3 sangue. Cloreto de sódio = 7.7 gr 1000 cm3 urina

Foto 2 — *Delvair* Hb = 5.25 gr 100 cm3 sangue. Cloreto de sódio = 9.2 gr 1000 cm3 urina

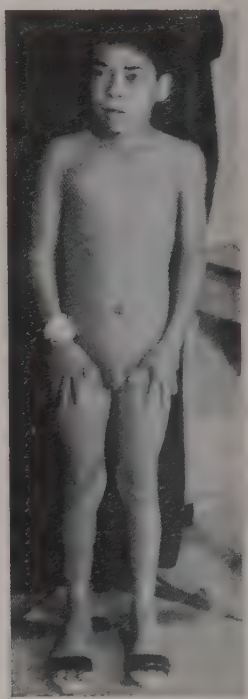


Foto 3 — *José V.* Hb = 4.65 gr 100 cm3 sangue. Cloreto de sódio = 2.6 gr 1000 cm3 urina

válvulas do coração podem se acompanhadas de diversa sintomatologia de insuficiência cardíaca, também na anemia ancilostomótica, uma vez terminado o período de equilíbrio, podem sobrevir sintomas que se encontravam frustos, em virtude de mecanismo de compensação.

SUMÁRIO

Os autores verificaram, em três casos de anemia ancilostomótica, diminuição acentuada na eliminação de cloreto de sódio na urina (2.5 g NaCl

em 1.000 cm3 de urina) e progressivo retôrno à normalidade, após administração isolada de sais de ferro, sem eliminação dos helmintos do intestino.

SUMARY

The authors have verified, in three hookworm anemia cases, marked decrease in urinary sodium chloride excretion (2.5 g NaCl in 1.000 cm3 urine) and progressive back to normal levels, after iron salts administration without elimination of worms from the intestine.

BIBLIOGRAFIA

1 — Castro Teixeira.
1929. Contribuição ao estudo do funcionamento renal na anemia pela ancilostomose. Tese de doutoramento.

2 — Major, R. H.
1924. Pernicious anemia and renal insufficiency. Johns Hopkins Hosp. Bull., 35, 390.

3 — Christian, H. A.
1916. Renal function in anemia. Arch. Int. Med., XVIII, 429.

Nota sobre Linognathus cervicaprae (Anoplura) (*)

por

Fabio Leoni Werneck

Parece-nos que a publicação da presente nota se justifica, tendo por fim evitar a confusão entre duas espécies nitidamente diferentes que, de outro modo, talvez ficasse estabelecida para sempre. Cumpre, contudo, confessar que não a publicamos com satisfação e, sim, por mero sentimento de dever para com os interessados na elucidação dos problemas taxonômicos relacionados aos anopluros. Preferíamos, com efeito, fôsse o assunto tratado por Fahrenholz. Todavia, como já se passaram mais de cinco anos após a origem da questão sem que, tanto quanto nos é possível saber, êste conhecido autor tenha podido se pronunciar a respeito, tomamos a deliberação de elucidá-la em breve comunicação.

Em 1938 redescrevemos *Linognathus cervicaprae*, uma das poucas espécies que Ferris não pudera obter e, consequentemente, estudar, quando se ocupou do gênero *Linognathus* em sua muito conhecida monografia sôbre piolhos sugadores. Nosso intuito era, então, preencher insignificante lacuna da referida obra, aproveitando a oportunidade que Miss Teresa Clay acabava de nos proporcionar, com a remessa de material colhido em um *Antilope cervicapra* do jardim zoológico de Londres. Baseamo-nos para identificar os parasitos recebidos a *Linognathus cervicaprae*, principalmente no fato de terem sido colhidos no hospedador tipo desta espécie. A extrema raridade dos casos de infestação de um mamífero por mais de uma espécie de anopluros do mesmo gênero, tornou tal prática corrente, sempre que as descrições originais dos parasitos não permitem agir de modo mais rigoroso. E a descrição de Lucas, conquanto ótima para a época, se enquadra nesta classe de descrições, podendo ser rigorosamente aplicada hoje a várias espécies do gênero *Linognathus*. Nestas condições, a única censura de que seríamos passíveis é de têrmos usado de material colhido num animal em cativeiro, talvês exposto a contaminação por parasito vindo de outro antílope.

(*) Recebido para publicação a 9 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

Mas, em nosso caso, a eliminação desta causa de êrro carece de importância, visto como os espécimes que serviram a Lucas para a descrição de *Linognathus cervicaprae* também provinham de um antílope de jardim zoológico, e não é possível afirmar que fôssem parasitos peculiares ao hospedador.

Do acima exposto se verifica que nossa identificação, embora provàvelmente certa, é de algum modo convencional.

Pouco tempo depois, Fahrenholz, desconhecendo nossa redescrição, redescreveu também *Linognathus cervicaprae,* de material que acreditava ter sido usado por Lucas. Transcrevemos adiante um trecho de seu trabalho onde transparece nitidamente esta suposição, aliás mais tarde confirmada em carta a nós dirigida:

"Die Art gehört mit zu den am frühesten beschriebenen Arten der Gattung *Linognathus;* nur *vituli, setosus* und *stenopsis* sind länger bekannt. Nichtsdestoweniger können wir uns bis heute keine klare Vorstellung von ihr machen, da sie nur in einem Funde bekannt ist. Glücklicherweise ist das Material noch in brauchbarem Zustande vorhanden und das Museum National d'Histoire Naturelle in Paris hat es mir freundlicherweise durch Herrn Séguy zur Bearbeitung überlassen.

Ferris hat richtig vermutet, dass die *Art Linognathus tibialis* sehr nahe steht und bereits auf die eventuell erforderlichen nomenklatorischen Konsequenzen aufmerksam gemacht. Die Unterschiede sind allerdings so gering, dass *"tibialis"* nunmehr nicht mehr als Art bestehen bleiben kann, vielmehr als Unterart zu *L. cervicaprae* gestellt werden muss".

Sucede, porém, que os exemplares usados para as duas redescrições — a nossa e a de Fahrenholz — pertencem a espécies inquestionàvelmente distintas, sendo de *Linognathus tibialis* os dêste último autor.

Nestas condições, se o material estudado por Fahrenholz tivesse sido, na realidade, o mesmo que serviu a Lucas, *Linognathus tibialis* (Piaget) 1880 seria sinônimo de *Linognathus cervicaprae* (Lucas) 1847, e novo nome se tornaria necessário para designar a espécie que chamamos *cervicaprae*. Entretanto, como Fahrenholz verificou posteriormente, o material obtido no Museu de Paris não pertencia sequer ao lote tipo da espécie em questão, circunstância que lhe tira todo valor documentário. Tão lastimável engano nos foi comunicado em carta de Achim bei Bremen, datada de 14-X-1939, nos seguintes têrmos:

"Seher erstaunt war ich, als ich unter den zuletzt von Ihnen erhaltenen Arbeiten auch eine Beschreibung zu *Linognathus cervicaprae* fand. Es steht nunmehr fest, dass Ihre Beschreibung die richtige ist, da das Material von dem typischen Wirt stammt. Bei dem Material, das meiner Beschreibung

zu Grunde lag, ist der Wirt *nicht* angegeben; es *sollte* aus dem Nachlass von Lucas stammen. Nun habe ich aber festgestellt, dass das mir aus Paris vorgelegte Material von Kolenati gesammelt ist."

Colecionados por Kolenati, é evidente que os espécimes estudados por Fahrenholz não foram os descritos por Lucas, porquanto êstes foram obtidos por Rouzet no jardim zoológico de Paris. Não importa o fato de terem ou não pertencido à coleção de Lucas: êste autor poderia ter identificado erradamente espécimes de um segundo lote de material aos que anteriormente havia descrito, coisa tanto mais verossímil quanto é notória a deficiência dos métodos de exame então em uso. Em meados do século passado, era, com efeito, impossível distinguir *tibialis* de *cervicaprae*.

De acôrdo com o acima exposto, julgamos ser *Linognathus cervicaprae* Fahrenholz (nec Lucas) simples sinônimo de *Linognathus tibialis* (Piaget), não havendo motivo para criação de subespécie.

Outro ponto, da maior importância, para o qual desejamos chamar a atenção, se relaciona ao hospedador dos espécimes descritos por Fahrenholz, que, segundo sua carta, é desconhecido. A menção de *Antilope cervicapra* feita em seu trabalho é, sem dúvida, resultante da suposição de que os referidos espécimes fôssem cotipos de *Linognathus cervicaprae*. Assim não há prova alguma de que *Linognathus tibialis* ocorra também neste antílope, como descuidadamente, poderia ser admitido.

BIBLIOGRAFIA

Lucas, M. H.

1847. Sur une nouvelle espèce d'épizoïque appartenant au genre *Haematopinus*, et qui vit parasite sur l'antilope des Indes. Annales de la Société Entomologique de France, vol. 5, págs. 531-537.

Piaget, E.

1880. Les Pediculines, págs. 646-647.

Ferris, G. F.

1932. Contributions Toward a Monograph of the Sucking Lice, fasc. 5, págs. 94.

Werneck, F. L.

1938. *Linognathus cervicaprae* (Lucas). Livro jubilar do Prof. Travassos, páginas 527-530.

Fahrenholz, H.

1939. Beiträge zur Kenntnis der Anopluren. IV. Mitteilungen aus dem entomologischem Verein Bremen, vol. 26, págs. 38-42.

Ensaios terapêuticos com penicilina. II — Sífilis (*)

(Nota prévia)

(Com duas figuras no texto)

pelos Drs.

A. E. Arêa Leão — F. Nery Guimarães e Genard Nobrega

Em comunicação preliminar, queremos referir nesta nota os resultados da experimentação com penicilina no tratamento da sífilis. Microorganismos espiralados parecem particularmente sensíveis à ação desta substância e o resultado do seu emprêgo em baixas doses no tratamento da bouba já foi publicado anteriormente. (Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, 40 (2): 195-200, 1944).

Os pacientes, em número de 6, foram internados no Hospital Evandro Chagas, e 3 dêles continuam em observação pelos próximos 6 meses, com reações sorológicas quinzenais.

Alguns procederam da Fundação Gaffrée-Guinle, pelo que aqui deixamos consignados os nossos agradecimentos ao Dr. Joaquim Mota pela maneira gentil com que atendeu ao nosso pedido. Em geral os indivíduos portadores de moléstias venéreas que freqüêntam êsse Serviço, são pessoas de nível moral precário, tornando-se difícil conservá-los no hospital logo que apresentem quaisquer melhoras, pois estas são por êles interpretadas como cura. Por isso, as observações em alguns casos não puderam ser completas, estando divididas em 3 grupos: A) *Casos clinicamente favoráveis, com abandono do tratamento por parte dos doentes;* B) *Caso parcialmente favorável, com abandono do tratamento por insuficiente (pelo menos nas doses empregadas)*; C) *Casos clinicamente favoráveis, com contrôle sorológico depois do tratamento.*

A) *Casos parcialmente favoráveis, com abandono do tratamento por parte dos doentes.*

Caso 1 — Lues primo-secundária.

R. J. A. O., brasileiro, 20 anos, branco, residente em Bangu e procedente da Fundação Gaffrée-Guinle. Doente há 3 meses. Apre-

(*) Recebido para publicação a 10 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

sentou ao exame: *protossifiloma* da margem do prepúcio; *placas mucosas hipertróficas*, do ânus; *placas mucosas* da garganta; *língua luética cerebróide;* gânglios inguinais hipertrofiados.

Presença de treponemas nas lesões do pênis, garganta e ânus. Reação de Wassermann positiva (++++). Iniciou as injeções de penicilina de 4/4 horas, usando-se ampolas de 200 u.O., em 4-5-44. Após as primeiras injeções, referiu sensação de ardume e intenso prurido no pênis, que se mostrou mais vermelho (reação de Herxheimer). Em 10-5-44, a pesquisa de treponemas nas lesões do pênis e ânus foram negativas. Em 14-5-44, essas lesões estavam cicatrizadas, enquanto as demais persistiam. No dia seguinte o paciente abandonou o hospital. Total de unidades Oxford: 13.200.

Caso 2 — Lues primo-secundária.

A. M., branco, 20 anos, solteiro, residente nesta cidade, procedente da Fundação Gaffrée-Guinle. Doente há 4 meses. Apresentava ao exame: *protossifiloma* na glande; *placas mucosas* na garganta. Cefaléia, tibialgia e externalgia à pressão. Presença de treponemas no cancro e nas placas mucosas. Reação de Wassermann positiva (++++). (O paciente é portador também de blenorragia, apresentando grande edema e infiltração do prepúcio, estrangulando a glande — *parafimose*). Iniciou as injeções de penicilina em 5-4-44. Foram usadas ampolas de 400 u.O., de 4/4 horas. No 13.° dia de tratamento, o cancro estava cicatrizado e o edema e infiltração do pênis desaparecidos, porém às placas mucosas persistiam, e por isso passou a receber 800 u.O. por injeção. Referiu então intenso prurido e ardume no pênis, que se mostrou mais vermelho, assim como as placas mucosas, e também cefaléia (reação de Herxheimer). Nenhuma outra modificação foi observada até 21-5-44, quando o paciente abandonou o hospital, tendo tomado um total de 50.000 unidades Oxford.

B) *Caso parcialmente favorável, com abandono do tratamento por insuficiente nas doses empregadas.*

Caso 3 — Lues primo-secundária.

A. O. G., 22 anos, solteiro, branco, procedente da Fundação Gaffrée-Guinle, residente nesta cidade à rua do Resende. Em resumo, apresentou ao exame: *protossifiloma* no dorso do pênis; *roséolas* no rosto e membros; *sifílides psoarisiformes* palmares e plantares; *placas mucosas* da garganta e véu do paladar. Gânglios inguinais

hipertrofiados, assim como os epitrocleanos; cefaléia frontal, dores espontâneas e exacerbadas pela pressão nos ossos longos, sobre-

De cima para baixo: Caso 4. J. S. — Condilomas sifilíticos. Fotos tomados antes e depois do tratamento com penicilina. A cicatrização completa dessas lesões processou-se em 18 dias. Caso 5. C. G. — Placas mucosas hipertróficas do ânus. Fotos tomados antes e depois do tratamento com penicilina. A cicatrização completa dessas lesões deu-se em 16 dias. Originais de F. Nery Gumarães. Foto de *J. Fontes*

tudo no rádio. Pesquisa de treponemas positiva no cancro e nas placas mucosas. Reação de Wassermann positiva (++++). Iniciou-se a aplicação de penicilina em 17-4-44, em injeções de

200 u.O., de 4/4 horas. Após as primeiras injeções, queixou-se de ardume e prurido no pênis, que se mostrava mais vermelho, assim como as roséolas, estando estas também pruriginosas (reação de Herxheimer). Após a 16.ª injeção foi negativo para treponemas o exame do cancro, o qual cicatrizou completamente no 12.º dia de tratamento. Em 30-4-44, imediatamente após um das injeções, o paciente experimentou dispnéia e forte dor precordial, sintomas que cederam alguns minutos depois. Visto não haver melhoras nas demais lesões, em 2-5-44 o paciente passou a receber 400 u.O. por injeção, sendo então observada nova reação semelhante à de Herxheimer, com exacerbação sobretudo das dores ósseas. Assim prosseguiu até 17-5-44, quando a dose por injeção foi aumentada para 800 u.O., pôsto que outras roséolas apareceram nada obstante o tratamento. Nova reação de Herxheimer foi então observada. Em 31-5-44, como as roséolas persistisem, foi suspenso o tratamento, passando o enfêrmo a tomar Néo-salvarsan. Total de unidades Oxford recebidas pelo paciente: 120.000.

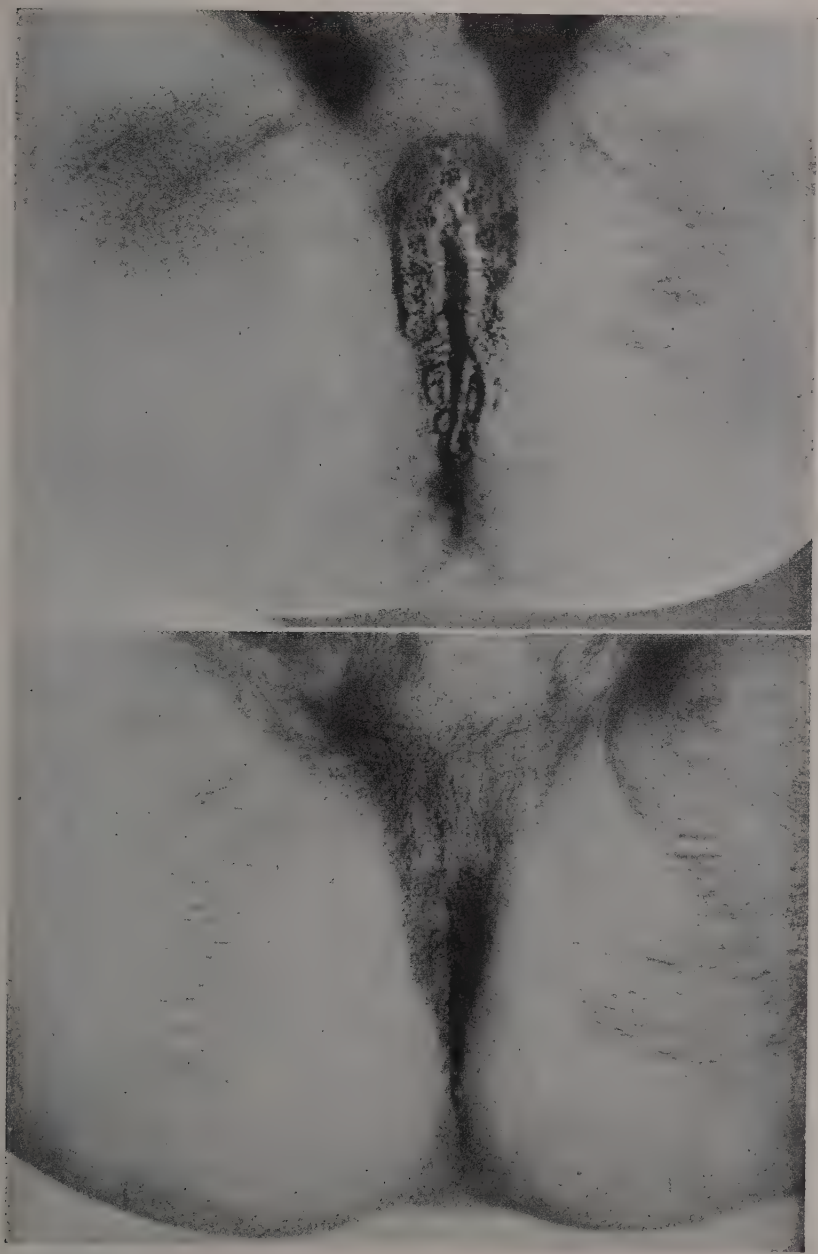
C) *Casos favoráveis, com contrôle sorológico depois do tratamento.*

Caso 4 — Lues primo-secundária.

J. S., pardo, 15 anos, residente em Bonsucesso (D. F.). Doente há dois meses. Apresentava lesões condilomatosas múltiplas, recobertas por secreção de odor fétido, distribuídas em tôrno do ânus e períneo. Gânglios inguinais hipertrofiados. Electrocardiograma normal- R. de Wassermann positiva (++++). Preparados de material das lesões mostraram abundantes treponemas. Não fôra submetido a nenhum tratamento anteriormente. Iniciada a aplicação de penicilina, de 4/4 horas, em 8-4-44. Bacterioscopia negativa em 14-4-44. Em 26-4-44 havia completa cura clínica das lesões. As injeções foram prolongadas até 12-5-44. Total de unidades Oxford: 40.400. Sorologia no quadro anexo.

Caso 5 — Lues primo-secundária.

C. G., pardo, 20 anos, solteiro, residente em Bonsucesso (D. F.). Doente há 8 meses. Apresentava extensas lesões pápulo-ulcerosas do ânus, com grande exsudação fétida. Diagnóstico clínico: *placas mucosas hipertróficas* do ânus. Em preparados feitos com material das lesões, encontraram-se abundantes *Treponema pallidum*. Reação de Wassermann positiva (++++). Ausência de outras manifestações luéticas cutâneas, mucosas ou cardiocasculares. Electrocardiograma normal. Fora do hospital, na suposição de gra-



Caso 6. J. T. S. Placas mucosas hipertróficas do ânus e períneo. Fotos tomados antes e depois do tratamento com penicilina. A cicatrização completa processou-se em 20 dias. Originais de F. Néry Guimarães. Fotos de *J. Fontes*

nuloma venéreo, foram-lhe aplicadas várias injeções de tártaro-emético. Em 19-5-44 foram iniciadas as injeções de penicilina, de 4/4 horas, observando-se bacterioscopia negativa em 27-5-44. Em 4-6-44 o paciente se encontrava clinicamente curado da lesão anal. As injeções prosseguiram até 24-6-44. Total de u. O: 42.000 Sorologia no quadro anexo.

Caso 6 — Lues primo-secundária.

J. T. S., branco, 18 anos, solteiro, residente em Quintino Bocaiuva (D. F.). Doente há 3 meses. Apresentou ao exame: extensa lesão ulcerosa vegetante do ânus e períneo, recoberta de secreção de odor fétido, e pequeno nódulo endurecido no prepúcio, que impedia a libertação da glande, embora esta não estivesse edemaciada. Gânglios inguinais palpáveis. Sôpro sistólico audível em tôda a área cardíaca, prevalentemente no foco pulmonar, onde se torna rude e alto. Propaga-se para a aurícula esquerda, ouvindo-se ainda distintamente no dorso, na fossa supra-espinhosa esquerda. Pela palpação do 2.º intercosto esquerdo ao lado do esterno, sente-se leve vibração sistólica. *Radiografia*: coração normal; contôrno do tronco da artéria pulmonar alongado e saliente, caracterisando ectasia. *Electrocardiograma*: freqüência: 88, *ritmo sinusal*: normal; *eixo elétrico*: desvio acentuado para direita +140° no triângulo de Einthoven. *Complexo auricular*: onda P normal. Intervalo PR = 0.18 segundos. *Complexo ventricular*: S_1 muito profundo; R_1 de amplitude baixa. R S_2 difásico. R_3 medianamente acentuada. Ondas T positivas; alta em D II. Conclusões: ritmo sinusal normal. Desvio do eixo elétrico para direita. Sobrecarga do coração direito. No material colhido da lesão anal, foram encontrados abundantes treponemas. Reação de Wassermann positiva (++++). Anteriormente não fôra submetido a nenhum tratamento. Diagnóstico clínico: Lesão cardíaca congênita. *Placas mucosas hipertróficas* do ânus. Iniciou a injeções de penicilina em 2-5-44, de 4/4 horas, usando-se doses de 200 u.O. Em 22-5-44 a lesão do ânus estava completamente cicatrizada. Com a finalidade de verificar se o uso prolongado da substância negativaria definitivamente as reações sorológicas, êste paciente continuou a receber as injeções até 17-7-44. Total de unidades Oxford recebidas: 90.000. Sorologia no quadro anexo.

Tôda a penicilina empregada proveio da produção do Instituto, e durante a realização do trabalho contamos sempre com o apoio e incentivo do Dr. H. Aragão. As injeções foram aplicadas intramuscularmente, de prefe-

rência na região glútea, de 4/4 horas, a dose por 24 horas variando de 1.200 a 4.800 unidades Oxford. Acidentalmente, alguns dos pacientes referiram dor por ocasião de algumas injeções. Um paciente apresentou forte dor precordial e dispnéia, após uma das injeções, tendo tais sintomas cedido logo em seguida.

Logo no início, ou no decorrer do tratamento, quando eram aumentadas as doses usadas, algus doentes apresentaram síndromas semelhantes à chamada reação de Herxheimer, freqüentemente observada com a aplicação de antiluéticos conhecidos (arsênico, mercúrio).

Os exames bacteriológicos foram feitos em preparados impregnados pela prata (método de Fontana-Tribondeau para os esfregaços e método de Levaditi para os cortes) e também a fresco, em campo escuro.

Foi verificado que lesões que respondem mais rapidamente de um modo favorável ao tratamento pelos arsenicais (condilomas sifilíticos, placas-mucosas hipertróficas) mostraram-se também mais rapidamente controladas pela penicilina. Tais lesões cicatrizaram completamente entre 10 e 20 dias, com doses de 1.200 unidades por 24 horas. Por outro lado, doses de 4.800 unidades, no mesmo espaço de tempo e durante 14 dias consecutivos, foram insuficientes para controlar outras manifestações luéticas secundárias (roséolas por exemplo). Qunto aos protosifilomas, obteve-se a cicatrização entre 10 e 13 dias de tratamento, com 1.200 a 2.400 unidades em 24 horas.

Nos 3 casos sob contrôle sorológico, observou-se que, não obstante a cicatrização das lesões apresentadas em início e o não aparecimento de outras quaisquer atribuíveis à sífilis, os testes continuaram positivos. Em dois dêsses casos, as reações se tornaram negativas, voltando depois novamente a positividade. Num dêles, com a finalidade de verificar se a continuação do tratamento viria negativar definitivamente as reações, prosseguiu-se com as injeções até 56 dias depois da cura clínica. O quadro 1 mostra os resultados dos testes.

Parece não precisar ser encarecida a importância profilática dêstes resultados, uma vez que brevemente, no nosso país, os dispensários anti-venéreos poderão ser supridos com penicilina para tratamentos coletivos (naturalmente não em quantidade suficiente para ministrar milhões de unidades por indivíduos). Porém, na clínica em geral, é sobretudo no tratamento anti-luético dos velhos e, mesmo entre os moços, daqueles com insuficiência hepática ou cárdiovascular, incapazes de suportar tratamento demorado com os arsenicais, que a substância vem a ser particularmente indicada. Do mesmo modo, no caso de pessôas que, por causas não bem definidas, apresentam fenomenos

HOSPITAL EVANDRO CHAGAS

RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS (R. DE WASSERMANN)

Datas	Caso 4 — J. S.	Datas	Caso 5 — C. G.	Datas	Caso 6 — J. T. S.
		—	—	—	—
13–4–44	Positiva — (++++)	—	—	4–5–44	Positiva — (++++)
23–5–44	Positiva — (+++)	23–5–44	Positiva — (+++)	—	—
29–5–44	Positiva — (+++)	29–5–44	Positiva — (++)	—	—
3–6–44	Negativa	—	—	8–6–44	Negativa
8–6–44	Positiva — (++)	8–6–44	Positiva — (+++)	17–6–44	Positiva — (+++)
17–6–44	Positiva — (+++)	17–6–44	Positiva — (+++)	3–7–44	Positiva — (+++)
3–7–44	Negativa	27–6–44	Positiva — (+++)	—	—
6–7–44	Negativa	—	—	11–7–44	Negativa
11–7–44	Negativa	—	—	20–7–44	Negativa
20–7–44	Negativa	20–7–44	Negativa	27–7–44	Positiva (+++)
27–7–44	Negativa	—	—	2–8–44	Negativa
2–8–44	Negativa	—	—	7–8–44	Negativa
7–8–44	Negativa	—	—		

alarmantes (cefaléia, febre, calefrios, etc.) cada vez que tomam "914". Finalmente, com a terapia penicilínica são afastadas as ameaças das "crises nitritóides", às vêzes fatais.

RESUMO

Seis sifilíticos foram tratados com penicilina em doses baixas, no Hospital Evandro Chagas, do Instituto Osvaldo Cruz.

Protossifilomas foram bacterioscópicamente negativos entre 3 e 6 dias e cicatrizaram completamente entre 10 e 13 dias, com a aplicação de 1.200 a 2.400 unidades Oxford por 24 horas.

Condilomas sifilíticos e placas mucosas hipertróficas tiveram bacterioscopia negativa entre 6 e 8 dias, e cicatrizaram completamente entre 10 e 20 dias, com a aplicação de 1.200 unidades por 24 horas, Porém, doses de 4.800 unidades, no mesmo espaço de tempo, foram insuficientes para controlar outras manifestações luéticas secundárias (roséolas, placas mucosas).

Em 3 casos sob contrôle sorológico, verificou-se que a negatividade das reações não acompanha imediatamente a cura clínica. Além disso, conforme já foi observado também com a bouba, os resultados dos testes sorológicos oscilam mezes a fio, negativando e voltando à positividade.

SUMMARY

Six syphilitic patients were treated with Penicillin in low dosis at the Evandro Chagas Hospital, of the Oswaldo Cruz Institute. Protosyphilomas were found to be bacterioscopically-negative in between three and six days, and cicatrized completely between 10 and 13 days, under applications of 1.200 to 2.400 Oxford units por 24 hours. Syphilitic condilomas and hypertrophic mucous patches, showed negative bacterioscopical results within between 10 and 20 days, under the applications of 1.200 Oxford units per 24 hours. Doses of 4.800 units, during the same period of time, however, found insufficient to control other secundary luetic manifestations (roseolar rash). In three cases under sorological control it was found that after a clinical cure had been effected, the Wassermann reaction showed considerable escillation, becoming first negative and then pesitive again.

Ensaios terapêuticos com penicilina III — Bouba
(Framboesia, pian, yaws) (*)

(Continuação)

Penicilina de procedência americana, empregada em doses baixas também cura aparentemente esta enfermidade

pelos Drs.

A. V. da Cunha — F. Néry Guimarães
A. E. Arêa Leão e Humberto T. Cardoso

(Com cinco figuras no texto)

Dada a rápida eliminação da penicilina, o que há é de todos conhecido, aconselhou um primeiro raciocínio que no emprêgo da mesma fôssem usadas doses elevadas, com a finalidade de mantê-la no sangue em concentração apreciável, para dêste modo se fazer sentir eficientemente sua ação contra os agentes patogênicos. Assim, na Europa e na América do Norte, é a penicilina ministrada em altas doses. Há mais de um ano o Instituto Oswaldo Cruz iniciou a produção desta substância, trabalhando com seus próprios recursos, e só quem conhece as dificuldades do preparo da mesma, pode avaliar o esfôrço que isto representa.

Desde o começo dos ensaios terapêuticos com a penicilina verificou-se que, mesmo com dosagens muito aquem das recomendadas pelos autores estrangeiros, era possível obterem-se resultados favoráveis em certas moléstias (pneumonias, gangrenas gasosas, septicemias etc.). Diante disso, foi resolvido então empregar as mesmas doses baixas no tratamento da bouba moléstia de manifestações cutâneas extensas, mas de tratamento fácil, o que permitia apreciar dos resultados da experimentação de um modo objetivo. Os primeiros resultados, muito favoráveis do tratamento da bouba pela penicilina preparada no Instituto Oswaldo Cruz, já foram publicados anteriormente (*Mem. do Inst. Oswaldo Cruz*, Tomo 40, Fasc. 2, Págs. 195-200, 1944).

(*) Recebido para publicação a 10 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

Como complemento dessas observações, resolvemos verificar o efeito da penicilina americana (Squibb, Lilly, Winthrop) no tratamento da bouba, empregada nas mesmas doses que a nacional (I.O.C.), usada anteriormente. Dêste modo, foram tratados 5 boubáticos, apresentando lesões semelhantes

Figura 1

Caso 9. Natalino F. Lesões apresentadas pelo paciente antes do tratamento. As lesões podais (*crab-yaws*) eram invadidas por *Tunga penetrans*. Notar a atitude erecta do observado, impossibilitado de pisar por causa dos cravos plantares. Essas lesões eram ricas de treponemas. Originais de F. Néry Guimarães. Fotos de *J. Pinto*

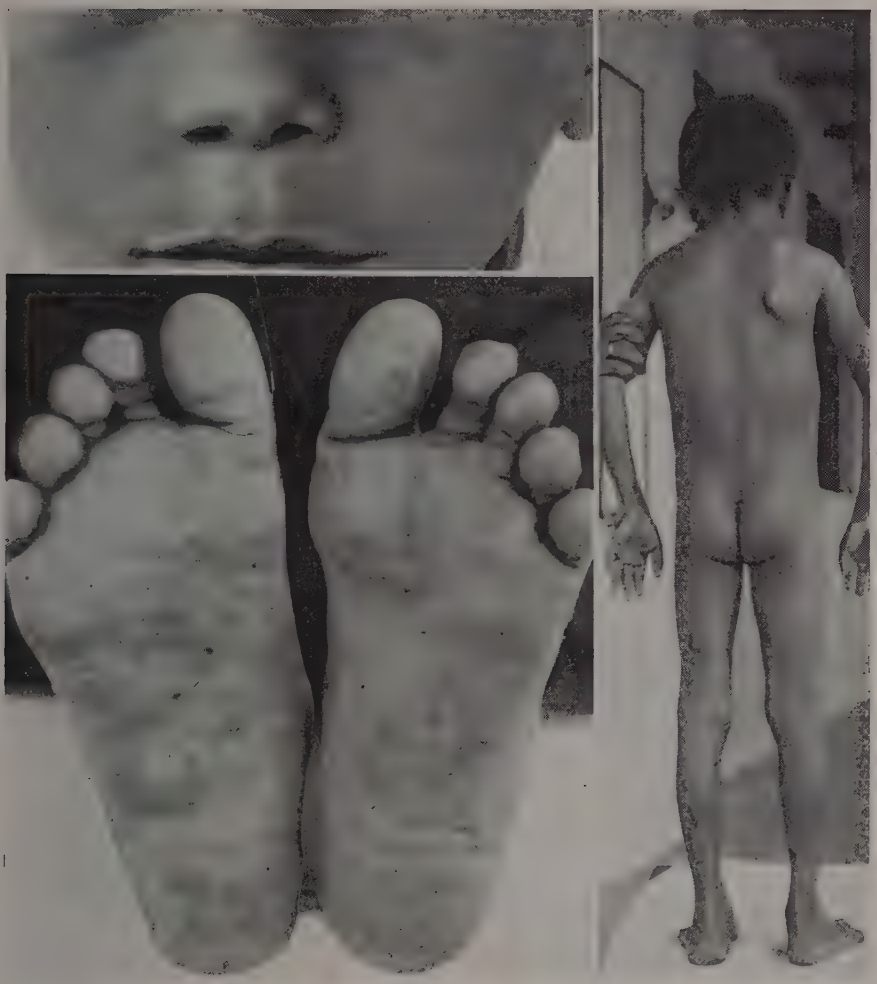


Figura 2

Caso 9. Natalino F. Depois do tratamento. Notar a atitude ereta normal do observado. São visíveis as cicatrizes das lesões boubáticas. Originais de F. Néry Guimarães. Fotos de *J. Fontes*

às dos 7 primeiros observados. Do mesmo modo que êstes últimos, os pacientes foram injetados intramuscularmente, de preferência na região glútea, de 4/4 horas, não sendo ministrado nenhum outro tratamento, além da penicilina. O contrôle bacterioscópico e sorológico foi também o mesmo.

Figura 3

Fotos tomados antes e depois do tratamento de dois observados: Em cima, caso 10. Lecy M.; framboesomas da bôca e das nádegas, tôdas contendo abundantes treponemas. Em baixo, caso 8. Romildes A.; grande framboesoma do maléolo externo, queratose do calcanhar e niquia. Originais de F. Néry Guimarães. Fotos de *J. Fontes*

O motivo do presente trabalho, é relatar que os resultados por nós conseguidos no tratamento da bouba com a penicilina americana em doses baixas (200 U. Ox. por ampola) foram os mesmos que com a nacional (I.O.C.). A cura clínica processou-se entre 12 e 25 dias, e a duração do tratamento variou de 20 a 45 dias. Quanto ao número de unidades Oxford empregadas por indivíduo em todo o tratamento, variou de 24.000 a 54.000. A marcha da cicatrização das lesões e as melhoras clínicas subjetivas, seguiram o curso anteriormente descrito. Também a cura imunológica não acompanhou imediatamente a cura clínica: muitos dias depois do tratamento a reação de Wassermann ainda era positiva.

Caso 8 — Romildes A., prêto, 6 anos, procedente de Mineiro, Rio Bonito (E. do Rio). Apresentava 5 framboezomas distribuídos no joelho direito e nos pés, além de oniquia e kerotose palmar e plantar. Presença de treponemas nas lesões pesquisadas. R. de Wa.: positiva (+++). Iniciado o tratamento com penicilina em injeções de 4/4 horas em 23-7-44. Cura clínica em 15 dias. Término do tratamento em 22-7-44. Total de u.O. recebidas: 35.000. Sorologia no quadro anexo.

Caso 9 — Natalino F., pardo, 9 anos, procedente de Mineiro, Rio Bonito (E. do Rio). Apresentava um total de 25 framboezomas, distribuídos no nariz, lábio sup., braços, nádega esquerda, coxas, pernas e pés. Presença de *T. pertenue* nas lesões pesquisadas. R. deWa.: positiva: (+++). As lesões podais eram contaminadas por *Tunga penetrans*, que foram prèviamente extraídas. Iniciado o tratamento com a penicilina também de 4/4 horas em 23-6-44. Cura clínica em 17 dias. Término do tratamento em 22-7-44. Total de u.O. recebidas: 35.000. Sorologia no quadro anexo.

Caso 10 — Lecy M., branco, 3 anos, procedente de Mineiro, Rio Bonito (E. do Rio). Apresentava ao exame um total de 14 framboezomas distribuídos na bôca, nádegas, coxas, pé direito. Presença de treponemas nas lesões pesquisadas. R. Wa. positiva: (+++). Foi iniciado o tratamento com penicilina americana em 27-6-44, observando-se cura clínica completa em 12 dias. Terminado o tratamento em 22-7-44. Total de u.O. recebidas: 30.000. Sorologia no quadro anexo.

Caso 11 — Milton B., branco, 7 anos, procedente de Parada de Lucas (Distrito Federal). Apresentava um total de 28 framboezomas, de diferentes tamanhos, distribuídos nos braços, pernas, coxas, nádegas, pênis e pés. *Treponema pertenue* foi encontrado nas lesões pesquisadas. (*Método de Fontana-Tribondeaux*). Foi internado no Hospital Evandro Chagas ao mesmo tempo que sua irmã Glória (caso 5 publicado ante-

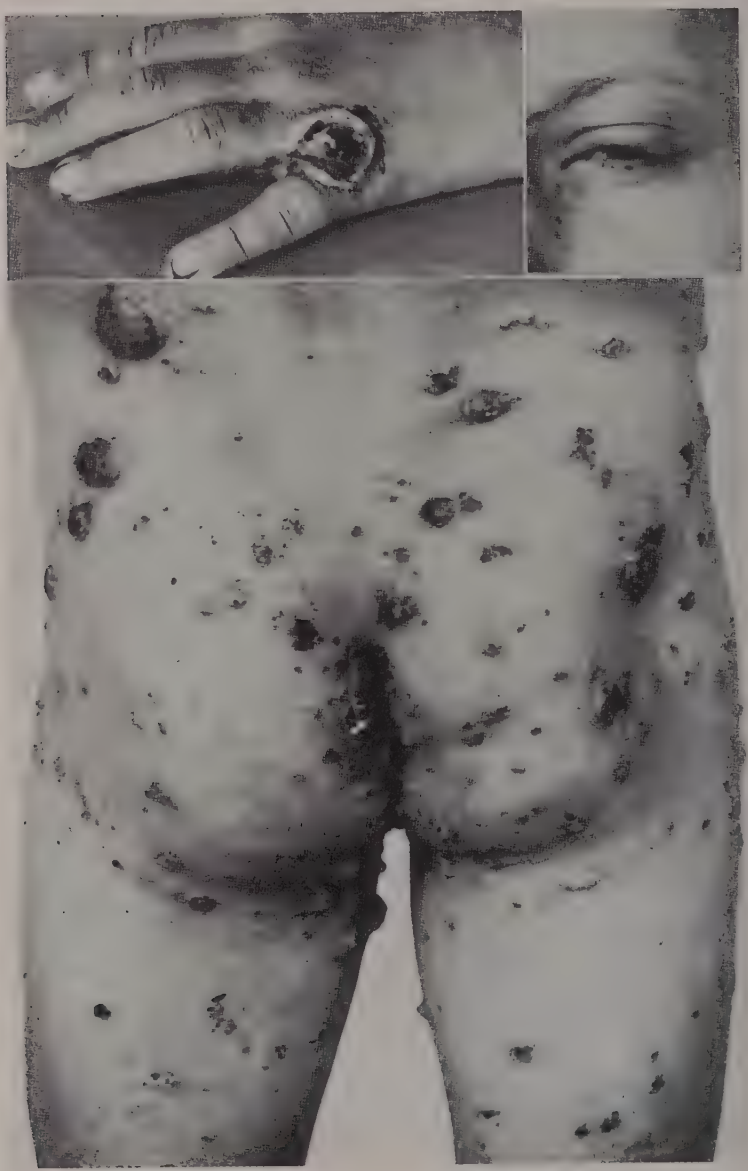


Figura 4

Caso 12. Gilson B. Lesões apresentadas pelo paciente antes de tratamento. Em detalhe, o protopianoma tipo ulceroso na mão e um pianoma secundário na pálpebra. Orgiinais de F. Néry Guimarães. Fotos de *J. Pinto*

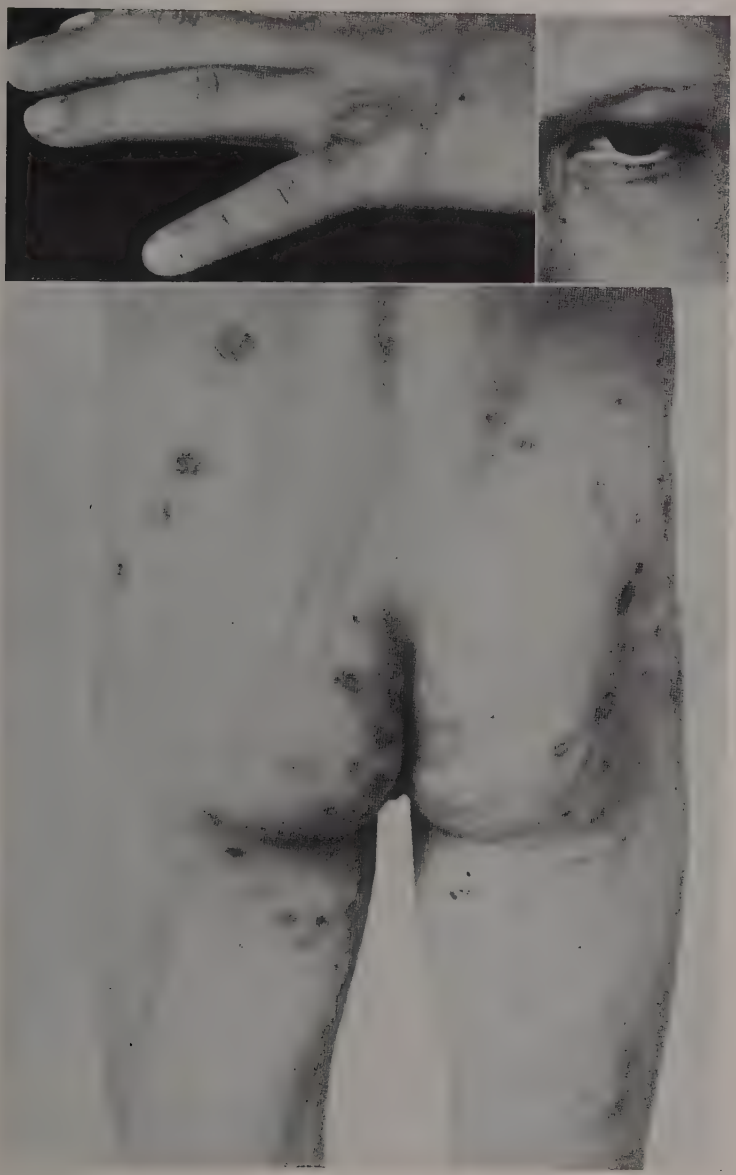


Figura 5

Caso 12. Gilson B. Depois do tratamento. São visíveis as cicatrizes das lesões boubáticas

riormente) não tendo recebido nenhum remédio durante todo o tratamento desta última. Suas lesões persistiram e evoluíram, aparecendo algumas novas. Em 24-4-44 iniciou o tratamento com Arsenox, tomando duas doses de 0.01 gr. e uma dose de 0.02 gr. As melhoras apresentadas foram mínimas. A reação de Wassermann continuava fortemente positiva: (++++). Interrompeu-se o tratamento e as lesões mostraram-se novamente ativas, com treponemas. Em 13-7-44 iniciou-se o tratamento com penicilina americana em injeções de 4/4 horas. Cura clínica em 16 dias. Término do tratamento em 4-8-44. Total de u.O. recebidas: 24.000. Sorologia no quadro anexo.

Caso 12 — Gilson B., 10 anos, branco, masculino, procedente de Parada de Lucas (D. F.) E' irmão do obs. do caso 11. Hospitalizado em período de erupção secundária e, apresentando ainda o protoframboezoma na mão esquerda. Permaneceu 18 dias sem tratamento, aumentando grandemente o número de lesões. Quando começou o tratamento, contavam-se cerca de 100 pianomas típicos de tamanhos variáveis, além de numerosas outras lesões polimorfas, tôdas de distribuição predominante nas nádegas, coxas, períneo, escroto, pênis e ânus. R.Wa. positiva — (++++). Pesquisa de treponemas —: positiva. Iniciou-se a aplicação de penicilina americana no dose de 200 u.O. de 4/4 horas em 30-8-44. Cura clínica em 25 dias. Terminado o tratamento em 14-10-44. Total de u.O. recebidas: 54.000. Sorologia no quadro anexo.

SUMMARY

Five patients of yaws were treated with american Penicillin (Squibb, Winthrop and Lilly), in small dosis. The treatment has been performed, using 200 Oxford units each 4 hours. The total amount of units "per" subject, has varied from 24.000 to 54.000.

A complete disappearence of the external lesions was obtained between the 12th and the 25th day of treatment.

ADENDO: — Todos os casos publicados anteriormente, os quais foram tratados com penicilina nacional, continuaram em observação até o presente, nenhum dêles tendo apresentado recidiva. O resultado dos testes sorológicos a que foram submetidos (R.Wa.) podem ser apreciados no quadro II. Verifica-se que os resultados mostraram-se oscilantes o que ainda se observa até o presente.

QUADRO — 1 SOROLOGIA DOS DOENTES TRATADOS COM PENICILINA AMERICANA (R. WASSERMAN)

DATA	Caso 8 R. A.	DATA	Caso 9 N. F.	DATA	Caso 10 L. M.	DATA	Caso 11 M. B.	DATA	Caso 12 G. B. (GILSON)
17.6.44	+++	17.6	+++	28.6	+++				
27.7	++	27.7	++	27.7	+++	12.7	+++		
7.8	++++	7.8	++++	7.8	++++	7.8	Negat.		
23.8	+++	23.8	Negat.	23.8	+++	23.8	+++	28.8	+++
11.9	+++	11.9	+++	11.9	+++	11.9	Negat.		
30.9	+++	30.9	+++	30.9	Negat.	30.9	Negat.	30.9	+++

QUADRO II — RESULTADOS DOS TESTES SOROLÓGICOS (R. DE WASSERMAM) DOS CASOS JÁ PUBLICADOS (continuação)

DATA	Caso 1 L. A. C. 17 anos	Caso 2 O. B. 13 anos	Caso 3 M. C. 4 anos	Caso 4 J. A. C. 16 anos	Caso 5 G. B. 4 anos	Caso 6 Cecilia 6 anos	Caso 7 N. S. 38 anos
8-6-44.....	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva (++)	Negativa	Positiva (+++)	Positiva (+++)
17-6-44.....	Negativa	Positiva (+++)	Positiva (+++)	Positiva (+++)	Positiva (+++)	;Positiva (+++)	Negativa
3-7-44.....	Negativa	Negativa	Positiva (+++)	Positiva (+++)	Positiva (+++)	Positiva (+++)	Negativa
13-7-44.....	Negativa	Negativa	Positiva (+++)	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
27-7-44.....	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Positiva (+++)	Negativa	Negativa
28-8-44.....	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa
11-9-44.....	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa

O malófago do urso dos Andes (*)

por

Fabio Leoni Werneck

(Com 4 figuras no texto)

Descrevemos, adiante, os espécimes colhidos na pele n.º 170.656 do United States National Museum, de Washington, com a necessária permissão de quem os encontrou, isto é do Prof. G. F. Ferris — gentileza que não foi senão uma das muitas com que tanto cativou durante nossa permanência na Universidade de Stanford, como beneficiário de uma bôlsa de estudos da John Simon Guggenheim Memorial Foundation.

Trata-se de uma espécie notável, tanto por seu tamanho como pelas particularidades características que apresenta. Estas ltimas nos dispensam de compará-la a qualquer dos *Trichodectes* conhecidos, mesmo aos peculiares a outros ursos, que, de modo algum se prestariam a confusão. Assim sendo, nosso trabalho se resume numa simples descrição, sem o acompanhamento de comentários inúteis.

TRICHODECTES FERRISI n. sp.

Fêmea (fig. 1), Comprimento: 2,20 mm.

Cabeça mais larga do que longa, tendo de largura máxima cerca de três quartos de seu comprimento; com a margem anterior curva, sem o menor achatamento ou reentrância na região mediana; têmporas mui ligeiramente salientes para tráz e margem occipital reta. O espessamento do tegumento nada apresenta de particular, a não ser uma acentuada saliência junto às fossas de implantação das antenas, para dentro do primeiro segmento dos respectivos apêndices. Das faixas resultantes do referido espessamento, as mais fortes se encontram ao longo do bordo anterior e do occipital, na face superior da cabeça ou na região anterolateral da face inferior. Pêlos em pequeno número, mas relativamente longos; alguns, cêrca de doze, formam uma fila

* Recebido para publicação a 15 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

transversal na face superior, para trás da borda anterior da cabeça, disposição esta pouco freqüente nas espécies do mesmo gênero.

Fig. 1 — *Trichodectes ferrisi*, Fêmea

Antenas curtas, tendo de comprimento menos de metade da largura da cabeça, com três segmentos aproximadamente iguais, embora o primeiro seja um pouco mais grosso.

Tubérculos oculares salientes.

Tórax mais curto e estreito que a cabeça, com muitos pêlos na margem posterior da face tergal do metatórax e forte espessamento tegumentar na face ventral, entre os quadris dos membros anteriores e medianos.

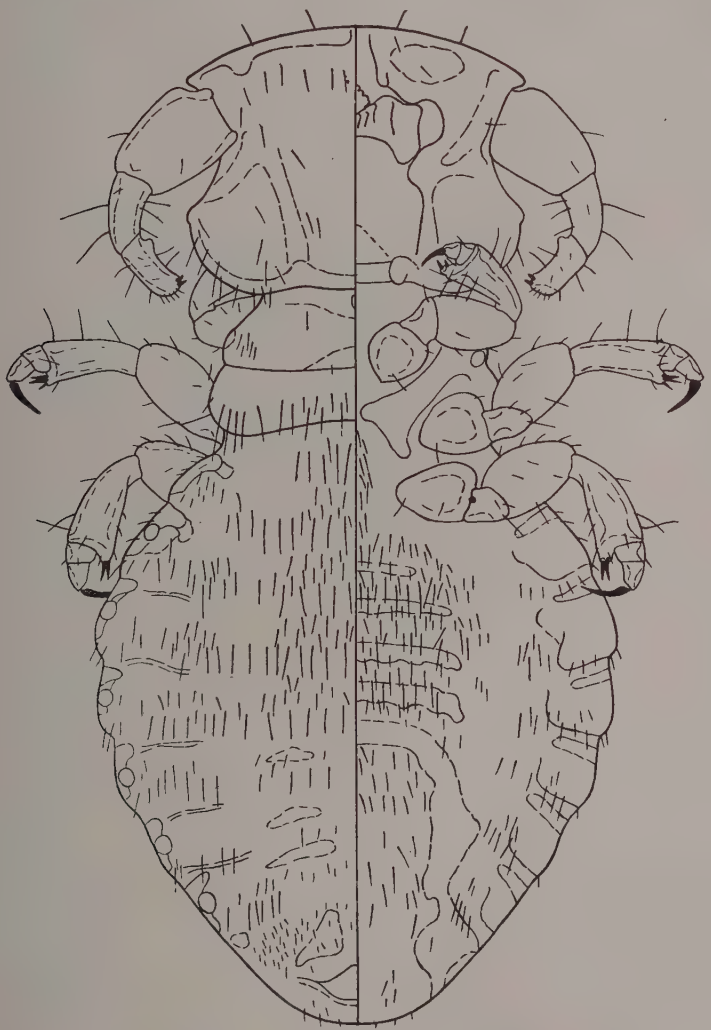


Fig. 2 — *Trichodectes ferrisi*, Macho

Membros da forma habitual; os dos dois últimos pares do mesmo tamanho e os anteriores ligeiramente menores. Todos com dois fortes espinhos na extremidade distal da tíbia oposta aos tarsos.

Abdome muito largo, tendo de largura máxima quase tanto quanto de comprimento. Em ambas as faces possui grande número de pêlos curtos, dispostos em filas tranversais irregulares, no tergitos, pleuritos e esternitos. Os da face superior se acumulam, de preferência, na região mediana, visto serem as filas anteriores de pêlos de cada tergito menores que a posterior; os da inferior, dependentes dos esternitos, se acham igualmente espalhados na superfície destas regiões dos segmentos abdominais, e só no espaço compreendido entre os quadris dos membros posteriores se pode notar um certo acúmulo.

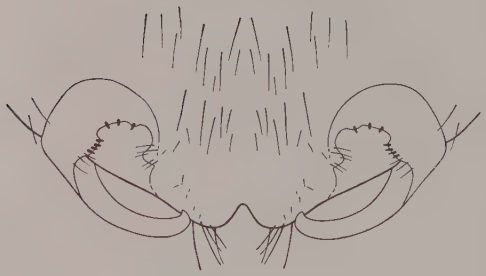


Fig. 3 — *Trichodectes ferrisi*, Região genital da fêmea

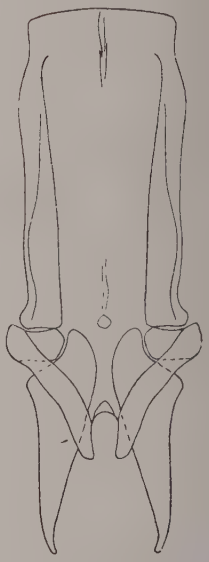


Fig. 4 — *Trichodectes ferrisi*. Aparêlho copulador do macho

Os pleuritos são mais pobres neste particular, apresentando, apenas, alguns pêlos no bordo posterior; todos os pleuritos, entretanto, são fortemente pigmentados, com uma faixa tranversal anterior e uma placa de coloração mais fraca em tôrno aos estigmas respiratórios. O abdome possui, ainda, uma faixa pigmentada no tergito correspondente ao último par de estigmas, e duas manchas laterais na extremidade posterior da face tergal.

Seis pares de grandes estigmas respiratórios abdominais.

Região genital (fig. 3) de tipo assaz freqüente nos malófagos de carnívoros, tendo como particularidade interessante alguns espinhos, curtos e fortes, nas margens internas das gonopófises, dos quais oito (quatro de cada lado) se encontram nos pequenos lóbulos aí existentes.

Macho (fig. 2). Comprimento: 2,22 mm.

Difere da fêmea pela forma das antenas, onde o primeiro segmento é consideràvelmente mais desenvolvido, e, conseqüentemente, por apresentar as fossas de implantação dêstes apêndices maiores, em detrimento do comprimento da região pré-antenal da cabeça.

Abdome mais oval, tendo duas pequenas manchas nos tergitos correspondentes aos três últimos pares de estigmas respiratórios e duas outras maiores, triangulares, junto à margem anterior do orifício genital. Na face inferior do abdome, há quatro placas esternais pigmentadas, adiante de grande placa genital, com a margem anterior e as laterais fortemente coradas. Em ambas as faces do abdome, o número de pêlos existentes é sensivelmente menor que na fêmea.

Aparelho copulador (fig. 4) formado por placa basal de margens paralelas; de endômeros fortes, com a extremidade posterior afilada e de pequenos parâmeros, representados por duas peças existentes entre as extremidades da placa basal e dos endômeros. Ligada aos parâmeros, há uma peça mediana, cujos ramos laterais se dirigem para dentro e para trás, que julgamos ser o pseudopênis. Tôda a vesícula-pênis é recoberta de pequenos espinhos que, em sua extremidade livre, se implantam de modo a lembrar uma impressão digital.

Hospedador tipo: *Tremarctos ornatus majori* Thomas, de Rubio, Venezuela.

Tipo: Um macho.

Alótipo: Uma fêmea.

Paratipos: Doze fêmeas e cinco machos.

Todo o lote tipo pertence ao Museu de História Natural da Universidade de Stanford, exceto dois machos e três fêmeas paratipos que nos foram cedidos.

Infecções experimentais na Leishmaniose Tegumentar Americana (*)

pelo

Dr. Aristides Marques da Cunha

Chefe da Divisão de Estudo de Endemias

Durante o estudo que empreendemos sôbre o valor da sôro-aglutinação no diagnóstico diferencial das espécies do gênero *Leishmania*, fomos levados a comparar amostras recentemente isoladas de diversas espécies dêsse gênero. Assim, ao lado das amostras de *Leishmania chagasi* (agente do Kalazar americano), tivemos oportunidade de ter em mão amostras recentemente isoladas de *Leishmania brasiliensis*, provenientes dos Estados de São Paulo e Minas Gerais.

Resolvemos, então, aproveitar a oportunidade, para executar algumas pesquisas sôbre as infecções experimentais na Leishmaniose tegumentar americana, assunto que nos pareceu insuficientemente estudado. Essas pesquisas, de que nos ocupamos há longo tempo, nos permitiram chegar a alguns resultados interessantes, entre os quais sobreleva a observação em macacos rhesus, experimentalmente infectados, de lesões mucosas que se assemelham às encontradas na infecção natural do homem e que já foram objeto de descrição sumária em nota publicada anteriormente.

O presente trabalho consta do relato detalhado das experiências efetuadas e de seus resultados.

Material e métodos de pesquisa. — As amostras de *Leishmania brasiliensis* que utilizamos em nossas experiências, provinham dos Estados brasileiros de S. Paulo e Minas Gerais, onde foram isoladas, sendo em seguida remetidas para o *Instituto Oswaldo Cruz*. As amostras com que obtivemos infecções experimentais foram as seguintes: Amostra *J. A.*, isolada em junho de 1937; amostra *Henrique*, isolada em setembro de 1937; amostra *Oscar*, isolada em setembro de 1938; amostra *Vicente*, isolada em maio de 1939; amostra *Vitorina*, isolada em agôsto de 1942. Tôdas essas amostras provinham do Estado de S. Paulo e foram isoladas pelo Dr. Luiz Sales Gomes, que teve a bondade de nô-las enviar juntamente com outras que, por motivos

(*) Recebido para publicação a 17 de agôsto de 1944 e dado à publicidade em outubro de 1944.

independentes de nossa vontade, não puderam ser aproveitadas, nessas pesquisas. Deixamos aqui consignados ao ilustre cientista paulista, os nossos melhores agradecimentos pelo muito que lhe devemos na excução de nossos trabalho.

Utilizamos ainda a amostra *Agostinho,* isolada em 27 de maio de 1938, no Estado de Minas Gerais, pelo Dr. Aroeira das Neves, que teve a gentileza de nô-la enviar e a quem também muito agradecemos.

As culturas eram inoculadas geralmente 1 a 2 meses depois de isoladas, e, sòmente uma vez com a amostra *Vicente,* a inoculação só foi praticada decorridos 4 meses após o isolamento. Usamos, às vêzes, culturas em meio de Nöller, empregando 2 a 3 tubos de cultura para cada animal; outras vêzes, usamos espêssas suspensões em água fisiológica, de flagelados cultivados em placas pelo método de Meyer e Ray. Os animais usados para inoculação foram o rhesus (*Macaca mulatta*), o cão, o hamster europeu (*Cricetus cricetus*), o camondongo branco e a cotia (*Dasyprocta agouti*). Os rhesus foram quase sempre inoculados na arcada superciliar por via intradérmica, e sòmente por exceção, também por via intradérmica, na superfície do nariz. Os cães foram inoculados ainda por via intradérmica, na superfície do nariz. Os hamster foram inoculados na base da cauda, assim como os camondongos. A cotia foi inoculada por via intradérmica na superfície do nariz. Sòmente obtivemos infecção nos dois primeiros animais, isto é, no rhesus e no cão.

Para o estudo da infecção, ao lado da observação do aspecto macroscópico das lesões, fazíamos punções para exame microscópico e cultura. Faziámos também, sistemàticamente, biopsias das lesões diversas fases de evolução, não só para pesquisa de parasita e sua localização, mas também para o estudo do aspecto microscópico das lesões. Os fragmentos de tecido retirados pela biópsia eram fixados em formol a 10% ou em Zenker-formol, e incluídos em parafina. Os cortes eram corados pela hematoxilina-eosina.

No caso de morte, praticávamos autópsia do animal.

Na maior parte dos casos, a morte do animal se deu após o desaparecimento das lesões. Nesse caso, fazíamos esfregaços dos órgãos internos, baço, fígado e medula óssea, com o fim de verificar uma possível generalização da infecção, o que nunca foi observado. Em dois casos porém, os rhesus apresentavam lesões mucosas, já visíveis em vida, nas bordas das narinas. Nesses casos, além das pesquisas destinadas a verificar a possível generalização da infecção já descritas, praticávamos um corte sagital do crânio deixando as duas metades apenas ligadas pela parte anterior da cavidade *nasofaríngea,* o que permitia o estudo das lesões aí encontradas e a retirada de fragmentos para o estudo parasitológico e histopatológico.

Infecção do rhesus — De acôrdo com o resultado de nossas experiências, é o *rhesus* o animal que melhor se presta para o estudo das infecções experimentais com a *Leishmania brasiliensis*. Evidentemente, não apresenta êsse animal a mesma sensibilidade que o homem. As lesões, quando exclusivamente cutâneas, ficam geralmente limitadas ao ponto de inoculação e só exepcionalmente se estendem às zonas vizinhas. Essas lesões tendem em geral para a cura, o que acarreta o desaparecimento total das mesmas. Também a tendência à ulceração é bem menos acentuada que no homem. Quanto à forma mucosa, observada pela primeira vez nas infecções experimentais do *rhesus*, ocorreu ela em dois animais dos 7 inoculados, o que corresponde a 28,5%. Essa percentagem é bem superior à de 10% consignada por alguns autores, mas inferior à registrada por Samuel Pessoa e Francisco Vilela em recente trabalho, percentagem essa por certo mais aproximada da realidade, dado terem êsses autores trabalhado *in loco* e levado em conta a duração da infecção, de grande influência para a exatidão do resultado, pois tôdas as formas são, de início, exclusivamente cutâneas. Ainda, o decurso da forma mucosa, no *rhesus*, difere um pouco da observada no homem. Embora as lesões dasmucosasnão tenham tendências para cura, pois em ambos os casos observados elas persistiram até a morte dos animais, seu desenvolvimento reveste-se de maior benignidade, não tendo as lesões tendência à destruição dos tecidos, antes apresentando caráter vegetante.

Os *rhesus* mostram-se sempre sensíveis à *Leishmania brasilensis*, uma vez que se empregue para a inoculação culturas recentemente isoladas (dentro do prazo máximo de 4 meses em nossas experiências) e em dose regular (cêrca de 3 tubos de Nöller para cada animal, conforme ficou anteriormente consignado). A influência da dose na obtenção da infecção fica claramente demonstrada na seguinte experiência: Três *rhesus* foram inoculadas com doses muito pequenas de uma cultura recentemente isolada (suspensão de placa muito pouco desenvolvida, paraos três animais) e não se mostraram infetados durante 3 a 4 meses, em que sobreviveram e foram observados. Entretanto, inoculando posteriormente um outro *rhesus* com dose grande da mesma amostra, esta se revelou virulenta, produzindo a infecção do animal (*rhesus* 14), embora tivessem decorrido 2 meses entre as duas inoculações. Êsse fato demonstra, de maneira inconteste, que a ausência de infecção dos três primeiros animais inoculados correu por conta da pequena dose empregada.

O prazo de 3 a 4 meses em que foram observados é suficiente para excluir a possibilidade de infecção, pois representa o dôbro do tempo máximo de incubação observado (cêrcade um m ês e meio). Além disso, três

outros *rhesus*, inoculados na mesma ocasião, com dose semelhante, de outra amostra (amostra *J. B.*) também recentemente isolada, não se mostraram infetados, apesar de observados por mais de um ano.

O decurso da doença nos *rhesus* experimentalmente infetados apresenta grandes variações. Não podemos, porém, tirar conclusão se se tratam de variações de virulência, pois inoculamos apenas um animal com cada uma das amostras.

O prazo de incubação observado em nossas experiências oscila entre 1 mês a 1 mês e meio; só em um caso, observamos prazo mais longo, de 2 meses.

Em um animal (rhesus 3722) apareceu um nódulo no ponto de inoculação, 18 dias após a mesma. Feita a biópsia no nódulo, observou-se nos cortes, grande número de células gigantes que constituíam a lesão predominante, encontrando-se, além disso, pequenos grupos de células monoucleares contendo *Leishmanias*. E' evidente que a existência no nódulo, observado macroscòpicamente, era devida à primeira das lesões acima descritas. Pensamos que a inoculação, juntamente com os flagelados, de pequenos fragmentos de agar proveniente do meio de cultura deram lugar à reação de corpo-extranho, representada pelas células gigantes acima referidas, bem como a formação do nódulo, fazendo pensar em um prazo de incubação mais curto que o realmente necessário para o aparecimentodas lesões. Realmente, nova biópsia, efetuada no mesmo nódulo 20 dias depois, mostrou o desaparecimento das células gigantes e a presença de lesões semelhanaes às encontradas nos outros casos.

Em um outro caso (rhesus 14), observou-se a formação do nódulo em prazo ainda mais curto (13 dias). A observação posterior veio mostrar a regressão e desaparecimento dêsse nódulo e a formação, mais tarde, de novo nódulo. E' claro que, nesse caso, o primeiro nódulo formado representava uma reação de corpo extranho devida ao material inoculado, à semelhança do que ocorreu no caso anterior, e só o nódulo formado posteriormente constituía lesão realmente produzida pelas *Leishmanias* inoculadas. Quando se inocula um animal em mais de umponto, o aparecimento das lesões não se faz em geral, simultânetmente. Na maior parte dos casos o aparecimento das lesões se faz com o intervalo de alguns dias. Em um caso porém (rhesus 4105), entre o aparecimento da lesão do nariz e das arcadas superciliares medeou um intervalo muito mais longo, dando lugar ao maior prazo da incubação observado, de cêrca de 2 meses. O decurso da infecção apresenta-se muito diferente, conforme as lesões se limitam à pele ou se estendem também as mucosas. No primeiro caso, a duração da infecção foi de 3 a 8 meses e

terminou pela cura com o desaparecimento total das lesões. O mesmo não acontece quando a infecção se estende à mucosa.

Nos dois casos que observamos, os animais sobreviveram 3 anos e meio, e 2 anos e meio respectivamente, persistindo as lesões até a morte dos animais.

Uma vez formada a lesão inicial, esta se desenvolve, podendo-se distinguir em sua evolução três fases distintas; a de crescimento, a de estágio e a de regressão, que termina pelo desaparecimento total da lesão. Essas fases se efetuam em prazos variáveis. À vezês, elas se processam tôdas em tempo muito curto (rhesus 2588), outras vêzes, elas se sucedem em prazos mais longos, predominando quase sempre a fase de estágio e de regressão (rhesus 3722 e rhesus 14).

Nas infecções recentes, quando o nódulo se acha ainda em período de crescimento, os parasitos são encontrados em grande número no interior de macrófagos.

Quando o crescimento do nódulo se faz mais lentamente e êste se aproxima do período de estágio, o número de parasitos decresce ràpidamente, de modo que, quando o nódulo se mostra estacionário, as *Leishmanias* se tornam raras, para desaparecerem quando o nódulo entra em regressão.

As lesões histopatológicas observadas são constituídas por infiltração de células mononucleares, com predominância a princípio de macrófagos, que muitas vêzes apresentam grande número de parasitos no plasma. Em fase muito recente da infecção, a infiltração não é contínua, de maneira a se observar zonas de infiltração mais intensa em meio a zonas em que esta é pouco acentuada. Com o decurso do tempo, aparecem linfócitos, que aumentam de número progressivamente, substituindo em grande parte os macrófagos. Nos casos mais avançados podemos observar hiperacantose mais ou menos acentuada. Ainda no caso de ulceração e quando se observa infecção secundária das lesões, estas são invadidas por polinucleares.

Passemos agora ao estudo dos animais em que as lesões se estendem às mucosas.

Primeiramente queremos deixar assinalado que não tínhamos em vista, em nossas experiências, a obtenção de forma mucosa, e assim as inoculações não foram feitas na mucosa e, sim, de maneira semelhante à dos outros animais. Foi assim que o rhesus 3969 foi inoculado apenas na arcada superciliar esquerda, e se o rhesus 4105 o foi também na superfície externa do nariz, o que té certo ponto poderia favorecer a extensão da infecção à mucosa, não foi isso com o fim de obter lesões mucosas e, sim, devido a razões outras que serão expostas posteriormente.

Queremos assinalar que um outro rhesus, o 4141, foi também inoculado na superfície do nariz, tendo a infecção se limitado à pele.

Na descrição da forma mucosa trataremos cada um dos 2 rhesus separadamente, pois o decurso da infecção apresenta entre êles diferenças acentuadas que tornam difícil uma descrição conjunta. Salientaremos depois os pontos de contato observados na infecção dêsses animais e que permitem algumas conclusões gerais sôbre a marcha de forma mucosa nas infecções experimentais do rhesus.

Descreveremos primeiramente a marcha da infecção do rhesus n.º 4105.

O animal foi inoculado com culturas em meio de Noller, de *Leishmania brasiliensis* (amostra *Henrique*), não só nas arcadas superciliares como no lado direito do nariz.

Cêrca de um mês após a inoculação, apareceu no supercílio direito pequeno nódulo avermelhado que cresceu e se acentuou logo depois. Dias depois observava-se o aparecimento de um nódulo semelhante na arcada superciliar esquerda. Êsses nódulos aumentaram de volume, apresentando-se o da arcada superciliar direita ulcerado.

Foi feita biópsia no nódulo da arcada superciliar esquerda, 52 dias depois da inoculação, para estudo histopatológico e pesquisa de parasito, verificando-se entço a presença de *Leishmania*. Passados 2 meses da inoculação, apareceu um terceiro nódulo, localizado no nariz, no ponto de inoculação. As lesões das arcadas superciliares evoluíram de maneira semelhante às observadas em outros animais, embora se mostrassem mais acentuadas e duradouras.

Cêrca de 6 meses após a inoculação, foi observado um nódulo avermelhado, não ulcerado, na extremidade do septo nasal. Êsse nódulo foi retirado por biópsia, apresentando ao exame histopatológico lesões de inflamação crônica, com infiltração de células mononucleares, tendo sido encontrados raros parasitos.

Após a biópsia as lesões cicatrizaram completamente.

Cêrca de 9 meses depois da inoculação, observavam-se ainda nas arcadas superciliares pequenas lesões ulceradas. Retirado por biópsia um pequeno fragmento para exame, revelou êste a existência das lesões de leishmaniose, não sendo possível porém o encontro de parasitos. Passados 20 dias, essas lesões haviam de todo desaparecido. Nessa ocasião, observou-se a formação, no nariz, de um novo nódulo, localizado no lado direito e formando como que um prolongamento do nódulo primitivo.

Decorridos cêrca de 18 meses após a inoculação, observou-se que os dois nódulos do nariz, ainda nítidos, apresentavam-se ulcerados e com crosta, enquanto a extremidade do septo nasal se apresentava ulcerada. Pouco tempo

depois, a crosta do nódulo esquerdo se destacou, deixando a superfície dêste completamente cicatrizada. O nódulo apresentava-se então endurecido e avermelhado. Nessa ocasião, isto é, 1 ano e 9 meses após a inoculação, foi feita punção, para cultura, nas bordas não ulceradas do nódulo direito do nariz, com resultado positivo para *Leishmania*. Outras punções para cultura foram praticadas mas, ou se conservaram estéreis ou se mostraram contaminadas.

Foi feita também a retirada, por biópsia, de um fragmento do nódulo direito, para estudo histopatológico.

Já há algum tempo, vínhamos observando que o animal apresentava certa dificuldade em respirar, mas só mais tarde, isto é, 1 ano e 10 meses depois da inoculação, observamos nitidamente a existência, na narina esquerda, de nódulos avermelhados, não ulcerados.

O decurso da infecção apresentava fases de exacerbação, alternando-se com fases de atenuação das lesões. Por vezes, essas fases faziam pensar em próxima cura do animal. Os períodos de exacerbação, no que se refere às lesões mucosas, eram sempre mais acentuados que os de atenuação, resultando daí o aumento progressivo dessas lesões. Quanto às lesões cutâneas, dava-se em geral o contrário, apresentando-se elas pouco a pouco menos acentuadas e terminando, no fim de 2 anos e 9 meses, completamente cicatrizadas. Entretanto, nessa época, ainda persistiam as lesões das mucosas, representadas por nódulos no interior de ambas as narinas, bem como ulceração da extremidade do septo nasal. Por diversas vêzes foram feitas biópsias, quer dos nódulos encontrados no interior das narinas, quer das bordas ulceradas das mesmas sendo encontradas, em algumas delas, *Leishmania*, embora sempre em pequeno número.

As lesões mucosas permaneceram sem maior alteração, a não ser a retração dos orifícios nasais até 9 meses após a cicatrização das lesões cutâneas. Resolvemos, então, sacrificar o animal a fim de podermos observar as lesões existentes na cavidade nasal. O exame das fossas nasais, efetuado após a abertura das mesmas por meio de um corte sagital, mostrou, em ambas as narinas, a existência de lesões vegetantes, constituídas por polipos de forma globosa irregular que obliteravam parcialmente o orifício nasal, principalmente o do lado direito, em que o polipo era mais volumoso.

Além dessas lesões, encontravam-se 4 pequenas saliências arredondadas ao nível do corneto médio. Não havia lesão ulcerada e a mucosa do faringe, epifaringe e laringe não apresentava lesões. O polipo mais volumoso, existente na fossa nasal direita, foi retirado a fim de servir para a inoculação de um outro animal sendo o outro aproveitado para exame histologico. O exame

microscópico dos cortes desse polipo revelou intensa infiltração de células mononucleares, com predominância de linfócitos. O epitélio mostrava por vêzes acentuada hiperacantose. Ao nível das lesões observadas no corneto médio havia também infiltração de células mononucleares, porém em grau mais moderado. O epitédio do corneto se apresentava íntegro.

Passemos agora a descrever a evolução da infecção no Rhesus nº. 3969. o 2º. animal de nossa série em que as lesões se estenderam às mucosas. A inoculação foi feita, como nos demais, por via intradérmica, na arcada superciliar esquerda, empregando-se uma suspensão de Leishmanias da amostra *Vicente,* cultivada em placas de agar-sangue segundo Meyer e Ray. Essa cultura havia sido isolada cêrca de 4 meses antes. No fim de um mês e oito dias foi observado o aparecimento de dois pequenos nódulos na arcada superciliar esquerda. Êsses nódulos cresceram lentamente, tendo sido feita biópsia e punção para cultura, que deu resultado positivo para *Leishmania*. Em sua evolução, as lesões apresentavam certas características que diferiam das observadas nos demais animais. Assim, não se formou aqui no ponto de inoculação um nódulo único volumoso e saliente, mas, sim, lesões múltiplas, pouco elevadas e com grandes tendências para ulceração. Dêste modo, no fim de 3 meses após o aparecimento, eram as lesões constituídas por ulcerações, com crosta sem elevação, ocupando a arcada superciliar esquerda, sendo mais acentuadas, na parte externa da mesma, onde havia um nódulo ulcerado. Pouco a pouco as lesões se propagaram para a parte interna da arcada, ultrapassando os limites da mesma e estendendo-se até a base do nariz.

Decorridos 9 meses do início da infecção, apareceu na base do nariz um grupo de nódulos ulcerados, donde partia uma saliência em forma de cordão que ocupava o dorso do nariz, em cuja parte média terminava em uma zona inflamada e ulcerada que se estendia para o lado esquerdo do nariz, havendo na pàlpebra inferior direita uma pequena ulceração. O aspecto dessas lesões dava a idéia da propagação da infecção por via linfática, fato já admitido por muitos autores. Essas lesões persistiram, com pequenas alterações que denotaram tendência das lesões, principalmente as da arcada superciliar, para cicatrização, embora essa nunca se completasse inteiramente.

Passados dois anos do aparecimento das lesões, observou-se inflamação na extremidade do nariz. Foi feita biópsia da lesão, que revelou a presença de *Leishmania,* embora em pequeno número.

Mais tarde, foram observados pequenos nódulos no interior de ambas as narinas, tendo sido feita biópsia com resultado positivo para *Leishmania*. Pouco tempo depois, apareceu lesão na borda da narina esquerda, estendendo-se à parte vizinha do septo nasal.

Em abril de 1942, quando já eram decorridos dois anos e meio em que a infecção do rhesus vinha sendo observada, o animal amanheceu agonizante, sendo sacrificado e autopsiado.

As lesões observadas externamente constavam das ulcerações com crosta em via de cicatrização, ao longo da arcada superciliar esquerda, havendo na extremidade do septo nasal, bem como na borda da narina esquerda, lesões ulceradas. Feito o corte sagital do crânio com a mesma técnica empregada no animal anterior, observou-se lesões localizadas na cavidade nasal direita, do lado oposto àquele em que se havia praticado a inoculação.

As lesões, de caráter vegetante, eram constituídas por um volumoso polipo situado no atrium. Foram retirados fragmentos, não só da borda das narinas como do polipo e dos cornetos médio e superior. Ao contrário do que se pensava, quer os cortes do polipo, quer os das lesões da narina, revelaram grande número de parasitos, que eram extraordinàriamente abundantes nos cortes do polipo. Como se sabe, as Leishmanias localizam-se em vacúolos existentes no plasma dos macrófagos. Aqui, em certos pontos dos cortes em que os parasitos eram mais abundantes, observavam-se grandes vacúolos formados pela reunião dos pequenos, cheios de parasitos, sendo que algumas vêzes os macrófagos apresentavam-se com grande vacúolo único, limitado por delgada camada de plasma, com núcleo recalcado, e repletos de Leishmanias. As lesões microscópicas observadas, quer nos bordos da narina esquerda, quer ao nível do polipo da fossa nasal direita, eram constituídas por infiltração de células mononucleares, com grande predominância de macrófagos, a maior parte das quais cheias de parasitos. Por êsses caracteres elas diferem das observadas no animal precedente (rhesus 4105), em que predominam os linfócitos. A infiltração além disso, se mostra muito menos extensa que no animal precedente, limitando-se à zona compreendida entre o epitélio e a cartilagem, enquanto no rhesus 4105 ela se estende profundamente, ultrapassando de muito a zona cartilaginosa. Além da hiperacantose, observava-se por vêzes edema do epitélio (espongiose); bem como a presença de macrófagos cheios de parasitos, em pleno tecido epitelial. Algumas vêzes êsses macrófagos eram encontrados junto a borda do epitélio, separados da cavidade nasal por delgada pelicula. A rutura dessa pelicula, acarretando a libertação dos parasitos na cavidade nasal, explica o achado de *Leishmania* no muco nasal de indivíduos infetados. Pensamos que êsses macrófagos devem ser considerados como *células de Langherans*, existentes normalmente no epitélio e que são dotadas de poder fagocitário.

Comparando a marcha da infecção nos 2 animais, vemos que tudo indica que a propagação da infecção se fêz através as paredes do nariz.

No primeiro caso, a inoculação direta na superfície do nariz facilitou a propagação à mucosa, embora não fôsse por si só suficiente para justificar

êsse fato, pois um outro animal, o rhesus 4141, também inoculado na superfície do nariz e que apresentou no ponto de inoculação lesão semelhante à do rhesus 4105, não mostrou lesão mucosa. No 2.º animal, o rhesus 3969, a infecção da mucosa se deu após a propagação das lesões cutâneas à superfície externa do nariz.

As lesões mucosas se instalaram, pois, mais tardiamente, o que explica as diferenças existentes nas lesões observadas nos 2 animais.

Realmente, no rhesus 4105, em que as lesões eram mais antigas, elas eram mais extensas, e deram lugar a formação de polipos mais volumosos em ambas as narinas, havendo também lesões dos cornetos e infiltração em muito maior extensão. Além disso, enquanto no rhesus 4105 as infiltrações eram em grande parte constituídas por linfócitos, no rhesus 3969 predominavam os macrófagos muitos dos quais contendo numerosos parasitos.

Em ambos os casos porém, observou-se o tropismo da *Leishmania brasiliensis* para as mucosas e que, uma vez aí instalada, ela dá lugar a lesões persistentes, que progridem lentamente mas de maneira segura, com períodos alternados de atenuação e exacerbação com predominância sempre dêstes últimos, o que determina a agravação progressiva da doença. Enquanto isso se passa em relação às mucosas, as lesões cutâneas se atenuam pouco a pouco, com tendências para cicatrização, que foi completa no rhesus 4105 e muito acentuada no outro animal, sendo muito provável, dada a marcha das lesões, que a cicatrização fôsse completa se o animal não viesse a morrer de doença intercurrente.

Infecção do cão — As experiências efetuadas com cães foram em pequeno número, sendo inoculados apenas 3 animais, todos êles com o mesmo material, a amostra *J. A.* Os cães se mostraram menos sensíveis do que os rhesus, razão pela qual não fizemos maior número de experiências.

Os 3 animais foram inoculados por via intradérmica, na superfície do nariz, com o mesmo material, suspensão em água fisiológica de *Leishmania* de amostra *J. A.* isolada de rhesus 2588. Todos os animais se mostraram infetados no mesmo prazo e a marcha da infecção foi semelhante em todos três, sendo que apenas em um dêles, o cão B 3, as lesões foram menos pronunciadas. O prazo de incubação foi de cêrca de 2 meses, mais longo pois que o observado no rhesus. As lesões consistiam na formação de um nódulo no ponto da inoculação, e não apresentavam nenhuma tendência para ulceração, cicatrizando mesmo, após a biópsia que praticamos em dois dêles.

A infecção terminou pela cura espontânea dos animais, com o desaparecimento completo das lesões.

Apesar das inoculações terem sido feitas na superfície do nariz, circunstância que poderia facilitar a propagação das lesões à mucosa, esta não

foi afetada. Dois animais que morreram após o desaparecimento das lesões, foram autopsiados, procedendo-se o exame microscópico de esfregaços de baço e medula óssea a fim de verificar uma possível generalização da infecção. As lesões observadas nos fragmentos de tecidos retirados por biópsia, mostraram infiltração de células mononucleares, algumas contendo parasitos.

Infecção da cotia — Brumpt, tendo encontrado, em uma excursão no interior do E. de S. Paulo, uma cotia (*Dasyprocta agouti*) com uma úlcera no focinho, levantou a hipotese de ser essa úlcera produzida por *Leishmania* e de desempanhar, assim, êsse animal o papel de depositário silvestre de vírus na Leishmaniose tegumentar americana. Por êsse motivo, fomos levados, em nossas experiências, a inocular um animal dessa espécie. O material inoculado consistia em uma suspensão de Leishmanias da amostra *J. A.*, a mesma, aliás, que serviu para a inoculação dos animais de experiência precedente, que serviram assim como testemunha da virulência do material utilizado. Êsse animal, tendo sobrevivido 3 meses após a inoculação, nada apresentou, embora nesse período os cães se mostrassem infetados, o que demonstra a virulência do material empregado.

Essa esperiência, embora não permita conclusões definitivas, não é contudo favorável à hipotese levantada por Brumpt.

Inoculamos também alguns hamsters (*Cricetus cricetus*), já por via intraperitonial, já na base da cauda. Os animais morreram de moléstia intercurrente, muito cedo para permitir qualquer conclusão.

Também inoculamos alguns camondongos na base da cauda, sem obter contudo infecção.

Experiência de imunidade — Procuramos, ainda, em nossos estudos, verificar se a infecção, uma vez curada, daria imunidade para uma nova infecção. Só uma vez conseguimos realizar essa experiência. Em geral, os macacos, uma vez curados, morriam de moléstia intercurrente, antes que tivéssemos em mão uma amostra virulenta para realizarmos a reinoculação. A experiência única que realizamos foi feita com rhesus 2588. Êsse animal, inoculado primeiramente com a amostra *J. A.*, apresentou-se infetado, terminando a infecção pelo desaparecimento das lesões, conforme se pode ver no respectivo protocolo. Foi êle novamente inoculado na superfície do nariz com outra amostra, a amostra *Henrique*, servindo de testemunha o rhesus 4105, também inoculado com a mesma amostra. Empregamos uma amostra diferente da utilizada na primeira inoculação, a fim de evitar que se atribuisse qualquer fenômeno de imunidade, por acaso existente, a uma questão de amostra que não se entendesse a outras da mesma espécie. A inoculação da

superfície do nariz também foi feita, a fim de excluir a hipotese de uma imunidade local. Devendo o rhesus 4105 servir de testemunha a essa experiência, foi êle também inoculado na superfície do nariz.

O rhesus 2588, que havia sofrido infecção anterior, nada apresentou, enquanto o rhesus 4105 se mostrou infetado. Essa experiência mostra que uma infecção pela *Leishmania brasiliensis*, uma vez curada, confere completa imunidade a uma segunda infecção pelo mesmo protozoario.

Embora seja de lamentar que não tivéssemos podido repetir essa experiência, como era nosso desejo, queremos chamar a atenção para duas circunstâncias que concorrem, a nosso ver, para dar maior valor à experiência.

Em primeiro lugar está a benignidade da primeira infecção, que se curou no curto prazo de 3 meses; em segundo lugar, a virulência da amostra empregada, que deu lugar no animal testemunha, a uma infecção das mais graves na nossa série, estendendo-se mesmo às mucosas.

Discussão. Em nosso trabalho, empregamos como animais de experiência o *rhesus*, o cão o hamster (*Cricetus cricetus*) o camondongo e a cotia (*Dasyprocta agouti*). Sòmente com os dois primeiros foram obtidos resultados positivos. A infecção de macaco já havia sido anteriormente obtida, a princípio com cercopitecos e cinocéfalos e mais tarde com o *rhésus*, tendo sido êste último utilizado por Flaviano Silva e Eduardo Araújo, os primeiros a demonstrar a sensibilidade do *rhésus* a *L. brasiliensis*. Cães já haviam sido utilizados há bastante tempo, mostrando-se sensíveis à infecção. Em nossas experiências, as infecções que obtivemos no *rhésus* apresentavam, quanto à maneira porque evoluiam, duas modalidades; uma, quando as lesões se limitavam à pele, outra quando estas se estendiam às mucosas.

No primeiro caso, isto é, quando as lesões se limitam à pele, os resultados de nossas experiências concordam com os anteriormente obtidos por Dácio Franco do Amaral em seu trabalho sôbre as inoculações experimentais com a *L. brasiliensis*.

Quanto à extensão das lesões às mucosas, foi ela pela primeira vez assinalada no *rhesus* em trabalho que publicámos anteriormente.

Lesões da mucosa, fora do ponto de inoculação, já haviam sido assinaladas no cão por Dutra e Silva. Nos casos que observámos no *rhésus*, as lesões também apareceram em pontos diferentes dos que serviram para inoculação. As inoculações foram sempre praticadas na pele ou na arcada superciliar e na superfície do nariz (rhesus 4105) ou exclusivamente na arcada superciliar (*rhesus* 3969) e nunca nas mucosas onde depois apareceram as lesões.

De acôrdo com que ficou dito anteriormente, tudo leva a crer que à propagação à mucosa nasal se tenha dado através à espessura da parede

nasal pois, em um dos casos, a inoculação foi feita na superfície do nariz, e aí se desenvolveu uma lesão cutânea (*rhesus* 4105), e em outro, as lesões mucosas só apareceram após a propagação das lesões cutâneas à superfície do nariz (*rhesus* 3969).

Outro fato para o qual queremos chamar atenção é que as lesões, uma vez instaladas nas mucosas, progridem lentamente mas de maneira constante, sem apresentar tendência para cura, apesar da longa duração da doença que foi em um dos animais (*rhesus* 3969) de 2 e meio anos e um outro (*rhesus* 4105) de 3 e meio anos. Durante esse período, as lesões cutâneas ou cicatrizaram completamente (*rhesus* 4105) ou se mostravam em via de cicatrização (*rhesus* 3969). As lesões das mucosas observadas na infecção experimental do *rhesus* se assemelham às observadas no homem, embora não apresentem o carater destrutivo observado muitas vêzes neste último, mostrando antes tendência a tomar aspecto vegetante. Essa diferença pode ser explicada pela menor sensibilidade do *rhesus* a *L. brasiliensis*, fato que se revela também na marcha das lesões cutâneas, que mostram pouca tendência para ulceração, evoluindo para cicatrização que termina pela cura expontânea, fato raramente observado no homem. A extensão das lesões às mucosas ao que sabemos, não foi até agora observada nas infecções experimentais do *rhesus* pela *L. tropica*, constituindo, pois, o fato aqui referido, mais um carater que afasta a *L. brasiliensis* da *L. tropica*. Quanto ao valor que se pode atribuir a êsse caráter para a distinção das espécies, constitui assunto que merece algumas considerações. Até agóra não foi possível estabelecer uma distinção entre as diversas espécies do gênero *Leishmania* baseada em fatos experimentais. As reações de sôro-aglutinação, propostas para separação das espécies, conforme ficou demonstrado em trabalho anterior, não se prestam para êsse fim, pois, tôdas as amostras de *Leishmania*, qualquer que seja a espécie a que pertençam, apresentam, quando recentemente isoladas, idêntica constituição antigênica. Quanto às diferenças de comportamento observadas por diversos autores, em experiências em que não foi levada em conta a idade das culturas, são elas explicadas pelas modificações que sofrem as *Leishmanias* em sua constituição antigênica, devido ao envelhecimento das mesmas e independem completamente das espécies a que pertencem os flagelados em questão. Por outro lado, as diferenças no aspecto macroscópico das culturas em placas, assinaladas a princípio por Meyer e Ray e posteriormente por Meyer e Malamos como permitindo a distinção das espécies, de acôrdo com a longa experiência que temos do assunto, é êsse aspecto sujeito a grandes variações não só em uma mesma espécie, como dentro de uma mesma amostra, o que invalida o seu emprêgo com o fim para que foi proposto. Assim, a distinção das espécies do gênero *Leishmania*, tem que ser baseada no presente momento, exclusivamente sôbre a ação patogênica

do flagelado, quer a que se observa na infecção expontânea do homem, como a que resulta das infecções experimentais. De acôrdo com êsse critério, existem boas razões para considerar a *L. brasiliensis* como espécie independente e o fato aquí assinalado vem trazer mais um argumento em favor dessa idéia. Contudo, novos estudos são necessários para trazer mais sólidos fundamentos a validade da espécie em questão.

RESUMO E CONCLUSÕES

Rhésus foram infectados com culturas recentemente isoladas de *L. brasiliensis.*

As inoculações foram feitas por via intradérmica nas arcadas superciliares e, exepcionalmente, na superfície do nariz. O prazo da incubação foi de 1 a 2 mêses.

A marcha da infecção varia conforme as lesões se limitam à pele ou se estendem às mucosas. No primeiro caso, a duração da infecção foi de 3 a 8 meses e terminou sempre pela cura espontânea. Quando as lesões se estendem às mucosas elas persistem e se agravam, enquanto as lesões cutâneas observadas no mesmo animal, regridem, tendendo para cicatrização e cura. Cães também foram injetados com resultados positivos. As inoculações foram praticadas por via intradérmica na superfície do nariz. O prazo de incubação foi de cêrca de 2 mêses e as lesões observadas se limitaram à pele e terminaram pela cura.

Uma cotia (*Dasyprocta agouti*) foi inoculada não se mostrando infectada.

Um *rhésus,* curado de uma infecção pela *L. brasiliensis,* inoculado de novo com outra amostra do mesmo parasito, não se mostrou infectado.

A extensão das lesões às mucosas nas infecções experimentais do *rhésus* pela *L. brasiliensis,* fato ainda não verificado na *L. trópica,* constitue mais um argumento em favor da independência daquela espécie.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

Rhesus specimens were infected with recently isolated cultures of *L. brasiliensis.*

The inoculations were made intradermically into the superciliary arches and, exceptionally, into the skin of the nose. The incubation period was from 1 to 2 months.

The course of the infection varies according to the extention of the lesions if limited to the skin or invading the mucous membranes. In the first case. the infection lasted from 3 to 8 months and always terminated in spontaneous cure. When the changes extend to the mucous membranes. they persist and evolute. whilst the skin changes observed on the same animal become regressive and tending towards cicatrization and cure. Also dogs were inoculated with positive results. The inoculations were carried out by intradermic way into the skin of the nose. The incubation period was of about 2 months and the changes observed were confined to the skin and terminated in cure.

One agouti (*Dasyprocta agouti*) was inoculated but was not infected. One *Rhesus* which recovered from an infection by *L. brasiliensis*. reinoculated with another strain of the same parasite. was also not infected.

The extent of the changes to the mucous membranes. in experimental infections of *Rhesus* by *L. brasiliensis*. a fact not vet observed in *L. tropica*. constitutes one more argument in favour of the independence of the species.

PROTOCOLOS DAS EXPERIÊNCIAS

RHESUS N.º 2.588

(Amostra *J. A.*)

13 7 1937 Inoculado com cêrca de 4c.c. de suspensão de *Leishmania brasiliensis*. amostra J. A., em embas as arcadas superciliares.

20 8 1937 Foram observados nódulos nas 2 arcadas superciliares. Os nódulos foram puncionados para esfregaços e culturas. Tanto os esfregaços como as culturas foram positivos para *Leishmania*.

10 9 1937 Os nódulos apresentam início de regressão. Foi feita biopsia em um dos nódulos.

10/1937 Acentuou-se a regressão dos nódulos de modo que no fim dêsse mês êstes haviam desaparecido totalmente.

RHESUS N.º 3722

(Amostra *Agostinho*)

4 7 1938 Inoculado nas arcadas superciliares com suspensão de cultura de 2.ª passagem da amostra *Agostinho*.

22 7 1938 Foi observado um nódulo na arcada superciliar direita. Foi feito punção para cultura e biopsia. sendo as culturas positivas. Nos cortes foram encontradas Leishmanias.

25/ 7/1938 Aparece pequeno nódulo na arcada superciliar esquerda.

1 8 1938 O nódulo da arcada superciliar esquerda se mostra aumentado de volume. Foi feita punção para cultura e esfregaço. sendo ambos positivos.

11/ 8/1938 Biopsia do nódulo da arcada superciliar direita, sendo os cortes positivos para *Leishmania*. O nódulo da arcada superciliar esquerda se mostra ulcerado.
22/ 8/1938 Os nódulos se mostram aumentados de volume.
27/ 8/1938 Punção do nódulo da arcada superciliar esquerda com resultado positivo para *Leishmania*.
3/10/1938 Nódulos diminuídos de volume.
21/10/1938 Nódulos estacionários.
3/11/1938 Nódulos estacionários.
22/11/1938 Nódulos em franca regressão.
9/12/1938 Nódulos quase desaparecidos.
28/ 4/1939 Amanheceu morto. Nas arcadas superciliares nada mais se observava. Esfregaço de baço negativo para *Leishmania*.

RHESUS N.º 3.659

(Amostra *Agostinho*, isolada do Rhesus n.º 3722)

2/ 9/1938 Inoculado em ambas as arcadas superciliares, com cêrca de 1,5 cc de amostra *Agostinho* isolada do Rhesus n.º 3.722.
1/10/1938 Aparece pequeno nódulo na arcada superciliar direita.
5/10/1938 Observa-se também um nódulo na arcada superciliar esquerda.
6/10/1938 Foi feita biopsia do nódulo da arcada superciliar esquerda com resultado positivo para *Leishmania*.
26/10/1938 Os nódulos observados nas arcadas superciliares não se mostram tão desenvolvidos como nos outros casos observados, ocupando menos da metade da extensão da arcada, enquanto que nos outros ocupavam quase tôda.
3/11/1938 Os nódulos apresentam-se diminuídos de volume.
22/11/1938 Os nódulos apresentam-se estacionários.
14/12/1938 Nódulos em franca regressão.
21/ 1/1939 Amanheceu morto. Os nódulos das arcadas completamente desaparecidos. Esfregaços de baço negativos para *Leishmania*.

RHESUS N.º 3.784

(Amostra *Oscar*)

20/10/1938 Inoculado em ambas as arcadas superciliares com culturas de Amostra *Oscar*.
21/11/1938 Apresentava nas arcadas pequenos nódulos, sendo maior o da direita.
28/11/1938 Os nódulos continuam bastante pequenos.
6/12/1938 Os nódulos se mostram aumentados sem atingir as dimensões observadas em outros casos.
9/12/1938 Os nódulos se apresentam estacionários.
14/12/1938 Os nódulos se apresentam estacionários.
9/1 /1939 Nódulos em regressão.
27/ 3/1939 Amanheceu agonizante e foi sacrificado. Nas arcadas superciliares não se apresentava mais lesão. Esfregaço de baço negativo para *Leishmania*.

RHESUS N.º 14

(Amostra *Vitorina*)

4/11/1942 Inoculado na arcada superciliar esquerda com suspensão de placa e conteúdo de 3 tubos de Noller da amostra *Vitorina*.

17/11/1942 Nota-se pequeno nódulo no ponto de inoculação.

24/11/1942 O nódulo se mostra diminuído, desaparecendo em seguida.

21/12/1942 Aparece novo nódulo no ponto de inoculação.

28/12/1942 Foi feita punção para cultura que se mostrou positiva.

2/ 1/1943 Punção para exame microscópico que foi positivo para *Leishmania*.

20/ 1/1943 Foi feita biopsia para inclusão e inoculação de um outro *Rhesus* (*Rhesus* n.º 18).

5/ 2/1943 Foi tirada fotografia.

22/ 6/1943 Persiste pequeno nódulo na arcada superciliar esquerda.

RHESUS N.º 4.105

(Amostra *Henrique*)

29/10/1937 Inoculado em ambas as arcadas superciliares e no lado direito do nariz com suspensão de *Leishmania brasiliensis* (amostra *Henrique*).

22/11/1937 Nota-se na arcada superciliar direita pequeno nódulo avermelhado.

8/12/1937 O nódulo observado anteriormente acentua-se. Aparece um novo nódulo na arcada superciliar esquerda.

21/12/1937 Os nódulos das arcadas superciliares se mostram bem desenvolvidos, sendo que da arcada direita se apresenta ulcerado. Foi feita biopsia do nódulo da arcada superciliar esquerda, mostrando-se os cortes positivos para *Leishmania*.

30/12/1937 Apareceu um nódulo na superfície do nariz, no ponto de inoculação. Foi feito punção para cultura, sendo esta negativa. Foram efetuadas outras punções para cultura a 6, 12 e 20 de janeiro de 1938, também com resultados negativos. Atribuímos êsses resultados à elevada temperatura ambiente observada na ocasião.

19/ 4/1938 Foi observado na extremidade do septo um nódulo pequeno não ulcerado. Foi feita biopsia dêsse nódulo, sendo encontradas raras Leishmanias. Após a biopsia houve cicatrização da lesão.

3/ 8/1938 Nas arcadas superciliares persistem ainda pequenas lesões ulceradas. Foi feito biopsia que apresentava infiltração de celulas mononucleares e ausência de parasitos.

23/ 8/1938 As lesões das arcadas superciliares apresentam-se cicatrizadas, no nariz ao lado do nódulo assinalado aparece outro do lado direito.

21/ 6/1939 Na superfície do nariz observam-se 2 nódulos ulcerados. Na extremidade do nariz lesões ulceradas.

18/ 7/1939 O nódulo direito apresenta-se ulcerado, o esquerdo não ulcerado e duro. Extremidade do nariz ulcerada.

21/ 7/1939 Foi feita punção para cultura no ponto não ulcerado do nódulo direito com resultado positivo para *Leishmania.*

23/ 8/1939 Biopsia do nódulo esquerdo do nariz.

12/ 9/1939 Foi feita biopsia de um nódulo encontrado no interior da narina esquerda. Pesquisa de *Leishmania* nos cortes positiva.

2/10/1939 No interior de ambas as narinas observou-se nódulos ulcerados.

28/10/1939 Biopsia da borda ulcerada do nariz.

16/11/1939 Biopsia de um nódulo da narina esquerda.

22/12/1939 As lesões apresentam sinais de regressão, com diminuição das ulcerações das bordas do nariz.

2/ 1/1940 As lesões cutaneas do nariz quase cicatrizadas. Na extremidade do nariz ulcerações aumentadas com reação.

11/ 1/1940 Nas lesões cutaneas, queda da crosta deixando a superfície ulcerada.

22/ 1/1940 Na superfície do nariz, ulcerações com crostas. A extremidade do nariz continua ulcerada e no interior das narinas persistem os nódulos observados anteriormente.

4/ 3/1930 Lesões cutaneas em cicatrização. Persiste a ulceração da extremidade do nariz bem como os nódulos no interior das narinas.

25/ 4/1940 Lesões cutaneas completamente cicatrizadas. Persiste a ulceração da extremidade do nariz bem como os nódulos no interior das narinas.

11/ 9/1940 Persistem as mesmas lesões.

14/ 1/1941 Persistem as mesmas lesões.

18/ 2/1941 As narinas apresentam lesões. No interior de ambas as narinas existem nódulos avermelhados.

9/ 5/1941 Persistem as mesmas lesões. Nesse mesmo dia o animal foi sacrificado e autopsiado, sendo o resultado da autópsia o seguinte:

Macaco adulto, do sexo masculino, pesando 7,400 grs.; em 9-5-1941, data em que foi sacrificado. Inoculado há cêrca de 3 anos e meio com culturas de *Leishmania brasiliensis.* O animal acha-se em bom estado de nutrição.

FOSSAS NASAIS. Abertas as fossas nasais por meio de um corte sagital, segundo o processo clássico, nota-se em ambas as narinas a presença de formações poliposas de forma globosa, irregular, com larga base de implantação na mucosa, obliterando parcialmente o orifício nasal. O polipo é mais volumoso á direita, a obliteração da narina e orifício nasal mais pronunciada desse lado.

Na parede externa da fossa nasal esquerda, ao nível do corneto médio a mucosa mostra uma superfície irregular em virtude da presença de 4 pequenas saliências arredondadas a maior, ocupando a porção mais anterior do corneto. A mucosa é brilhante em tôda a extensão, não havendo lesões ulceradas. Mucosa do faringe, epifaringe e laringe sem alterações.

Na peça fixada em formol o polipo descrito na narina esquerda acha-se conservado, ao passo que o que existia na narina direita foi em grande parte destruído por ocasião da retirada de material para inoculação de outro animal. Secionada a narina esquerda por meio de cortes orientados paralelamente ao septo nasal, vê-se que o polipo está inserido por larga base de implanteção sôbre a face externa da narina. As suas dimensões são: 7x4x5 mms. Ocupa mais de ¾ da cavidade da narina esquerda, obliterando de modo apreciável, o orifício da fossa nasal correspondente.

RHESUS N.º 3.969

(Amostra *Vicente*)

12/ 9/1939 Inoculado com 2cc de suspensão de *Leishmania* cultivada em placas na arcada superciliar esquerda.

20/10/1939 Foram observados 2 pequenos nódulos na arcada superciliar esquerda.

25/10/1939 Os nódulos continuam pequenos.

27/10/1939 Foi feita biopsia em um dos nódulos, mostrando os cortes numerosos parasitos.

23/11/1939 Os nódulos se mostram aumentados de volume.

5/12/1939 Foi feita punção para cultura sendo esta positiva.

22/12/1939 As lesões observadas são constituídas por ulceração com crosta e sem elevação na arcada supersiliar esquerda.

2/ 1/1940 As mesmas lesões precedentes.

11/ 1/1940 As mesmos lesões precedentes.

12/ 3/1940 As mesmas lesões precedentes.

22/ 5/1940 Ao longo da arcada superciliar esquerda ulceração com crosta, senda mais acentuadas na extremidade externa da mesma.

5/ 7/1940 Na arcada superciliar esquerda, ulceração com crosta que ocupa tôda a extensão desta, estendendo-se ao espaço existente entre as duas arcadas.

18/ 7/1940 Na arcada superciliar esquerda, persistem as ulcerações com crosta. Entre as duas arcadas, existe um nódulo ulcerado, donde parte uma elevação em forma de cordão que ocupa o dorso do nariz e termina em uma região inflamada e ulcerada na parte média dêste, estendendo-se para o lado direito do mesmo. Na palpebra inferior existem duas pequenas ulcerações.

11/ 9/1940 As mesmas lesões precedentes.

5/12/1940 Foi feita biopsia de uma lesão situada na pálpebra inferior esquerda. Nos cortes encontram-se raros parasitos.

18/ 2/1941 Na arcada superciliar esquerda ulceração com crosta em via de cicatrização. No lado do nariz observa-se um nódulo.

24/ 3/1941 As mesmas lesões observadas anteriormente. Foi feita punção para cultura do nódulo do nariz.

24/ 9/1941 Biopsia da arcada superciliar esquerda. Resultado positivo para *Leishmania*.

6/11/1941 Apareceu inflamação na extremidade do nariz. Foi feita biopsia dessa região com resultado positivo para *Leishmania*.

15/ 1/1942 No interior da narina direita observam-se pequenos nódulos; foi feito biopsia de um dêsses nódulos com resultado positivo para *Leishmania*.

8/ 4/1942 O macaco foi encontrado agonizando; foi sacrificado e autopsiado.

Peso-líquido 800 grs., Sexo-masculino.

Lesões da arcada superciliar quase cicatrizadas. Lesões da superfície do nariz em via de cicatrização. Na borda da narina esquerda, lesão vegetante com cerca de 8 mm. de extensão por 3 a 4 de largura e com ulceração superficial.

Abertas, as fossas nazais por meio de um córte sagital, segundo o processo clássico, nota-se na narina direita, a presença, no *atrium*, de formações polipoides, de forma irregular, obliterando, pecialmente, o orifício nazal. Ao nível do corneto superior, observa-se também a existência de algumas massas poliposas de forma globulosa.

A narina esquerda nada apresenta de anormal.

CÃES B1, B2 e B3

16/ 8/1937 Foram inoculados 3 cães, (os cães B1, B2, B3) com amostra *J. A. na* extremidade do nariz,

14/10/1937 Os 3 cães apresentam nódulos no ponto de inoculação, sendo feito biopsia em um dêles, (B1). Os cortes foram positivos para *Leishmania*.

25/10/1937 Foi feito biopsia em outro cão (B2). Os cortes foram positivos para Leishmania.

O 3.º cão (B3) apresentava uma lesão bastante mais acentuada que os demais.

19/ 4/1938 Morreu o cão B2. O nódulo do nariz havia desaparecido. Esfregaço do Baço e Figado negativo para Leishmania.

4/ 5/1938 Morreu o cão B3 que não mais apresentava lesão. O cão B1 também não apresentava mais lesão, foi despresado.

COTIA

16/ 8/1937 Uma cotia (*Dasyprocta agouti*) foi inoculada no nariz com a amostra de *J. A.* (O mesmo material com que foram inoculados os cães precedentes).

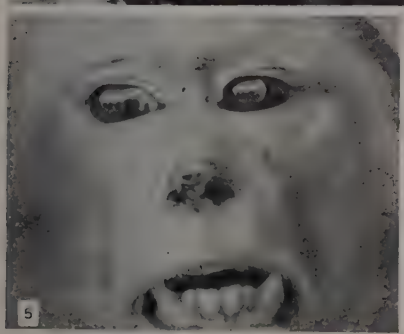
26/11/1937 A cotia morreu sem ter apresentado lesão.

ESTAMPA 1

Fig. 1 — Rhesus 4105, 93 dias após a inoculação.
Fig. 2 — Rhesus 4105, 62 dias após a inoculação.
Fig. 3 — Rhesus 4105, 1 ano 7 meses e 23 dias após a inoculação.
Fig. 4 — Rhesus 4105, 1 ano 8 meses e 20 dias após a inoculação.
Fig. 5 — Rhesus 4105, 2 anos 7 meses e 27 dias após a inoculação

---

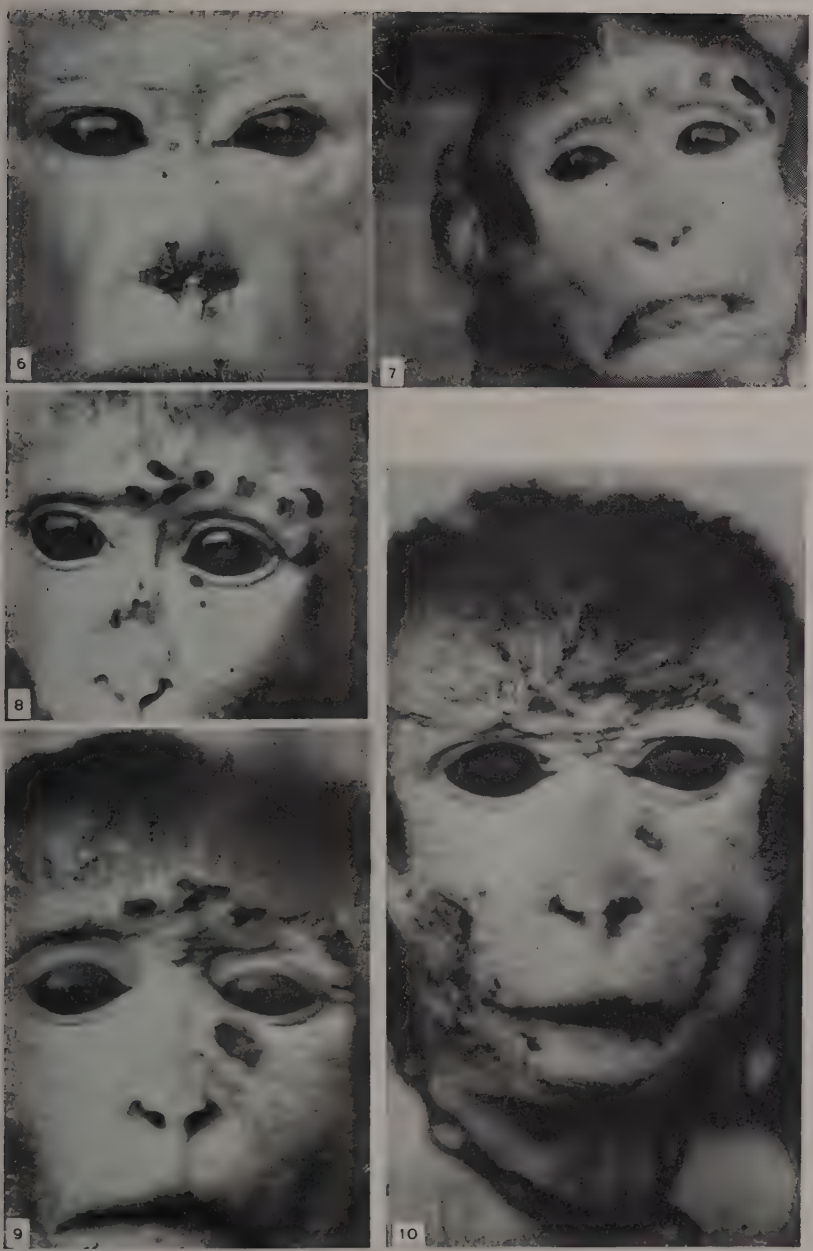
Nota — As fotografias das estampas I e II são de J. Pinto e tôdas as demais de Miguel Cezar e J. Fontes.



Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

ESTAMPA 2

Fig. 6 — Rhesus 4105, 3 anos 2 meses e 16 dias após a inoculação.
Fig. 7 — Rhesus 3969, 8 meses e 10 dias após a inoculação.
Fig. 8 — Rhesus 3969, 10 meses e 8 dias após a inoculação.
Fig. 9 — Rhesus 3969, 1 ano 11 meses e 10 dias após a inoculação.
Fig. 10 — Rhesus 3969, 2 anos, 6 meses e 27 dias após a inoculação.



Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

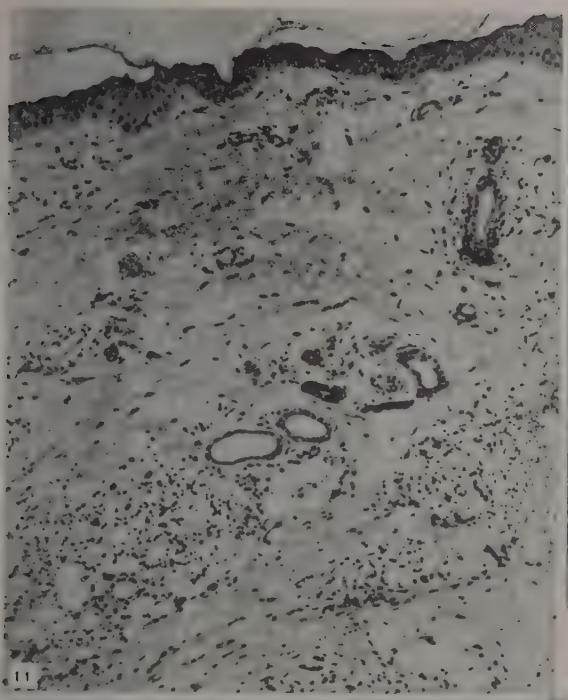
ESTAMPA 3

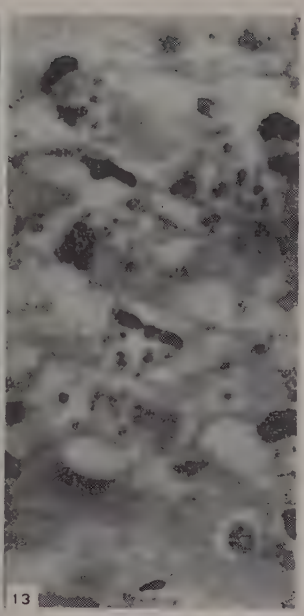
Fig. 11 — Rhesus 3659. Corte do nódulo da arcada superciliar, 1 mês e 4 dias após a inoculação, mostrando infiltração descontínua do derma (aumentada 110x)

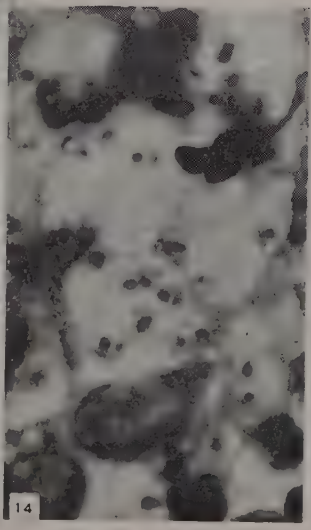
Fig. 12 — Rhesus 3722. Corte do nódulo da arcada superciliar, 1 mês e 7 dias após a inoculação mostrando infiltração do derma (aumentada 95x.).

Fig. 13 — Rhesus 3659. O mesmo corte da figura 11 com maior aumento deixando ver as Leishmanias (aumento 1500x.).

Fig. 14 — Rhesus 3659. O mesmo corte da figura precedente com maior aumento (aumentada cêrca de 1800x.).







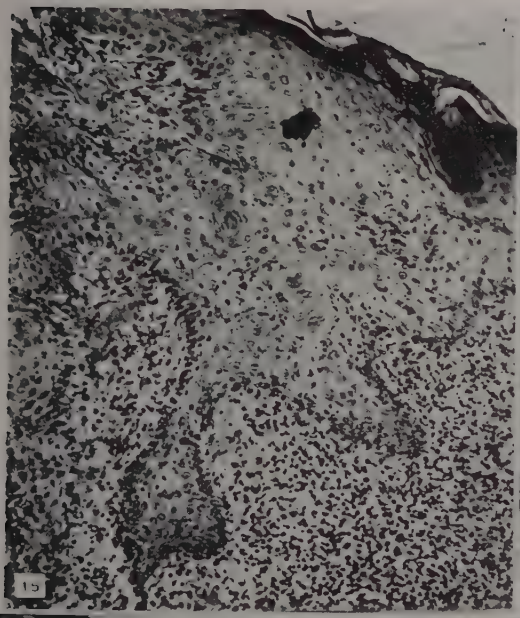
Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

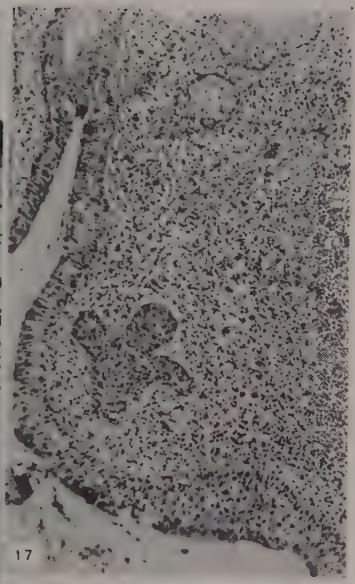
ESTAMPA 4

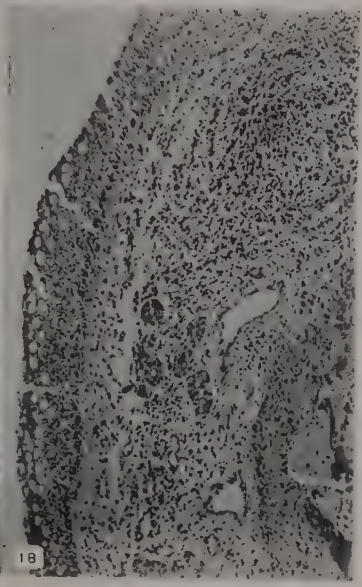
Fig. 15 — Rhesus 4105. Corte de um nódulo do interior da narina, retirada por biopsia, mostrando infiltração do derma e hyperacantose (aumentada 126x.).

Fig. 16 — Rhesus 4105. Corte de um pólipo encontrado no interior de uma das narinas, mostrando infiltração do derma (aumentada 95x).

Fig. 17 e 18 — Rhesus 4105. Corte do corneto médio mostrando infiltração do derma com o epitélio integro (aumentada 80x.).







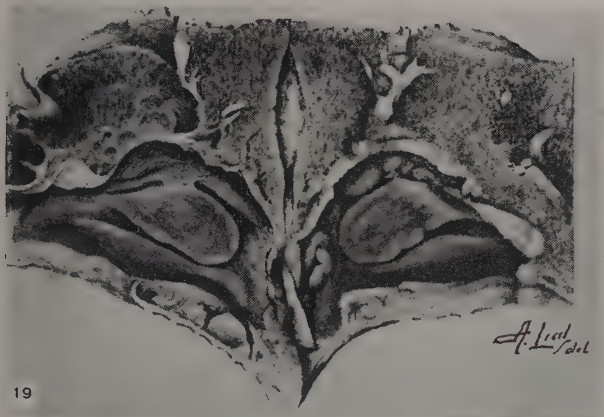
Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

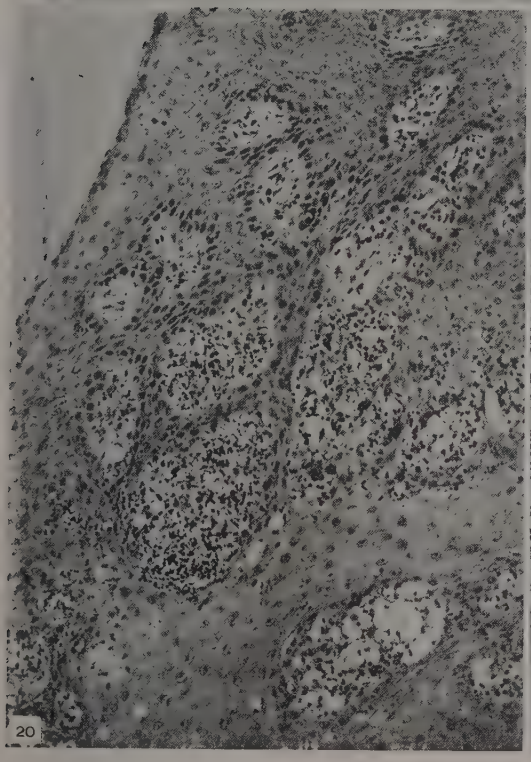
ESTAMPA 5

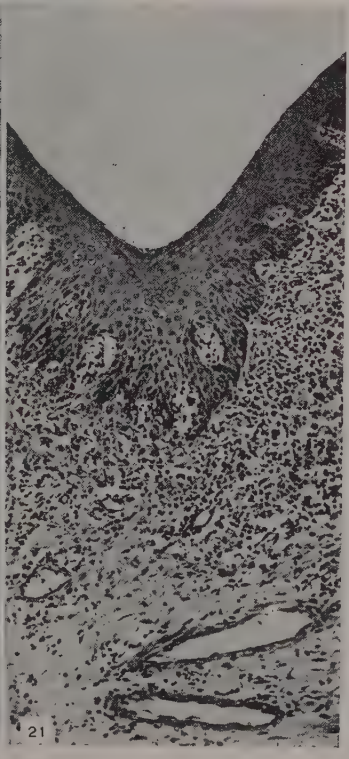
Fig. 19 — Rhesus 3969. Corte do crânio mostrando o interior das fossas nasais. (Desenho de A. Leal em tamanho natural.)

Fig. 20 e 21 — Rhesus 3969. Corte do pólido existente na narina direita. Infiltração do derma e hiperacantose que se mostra mais intensa na figura 20.

Fig. 22 — Rhesus 3969. Corte do mesmo pólipo, com maior aumento, deixando ver os parasitos (aumentada 1800x.).





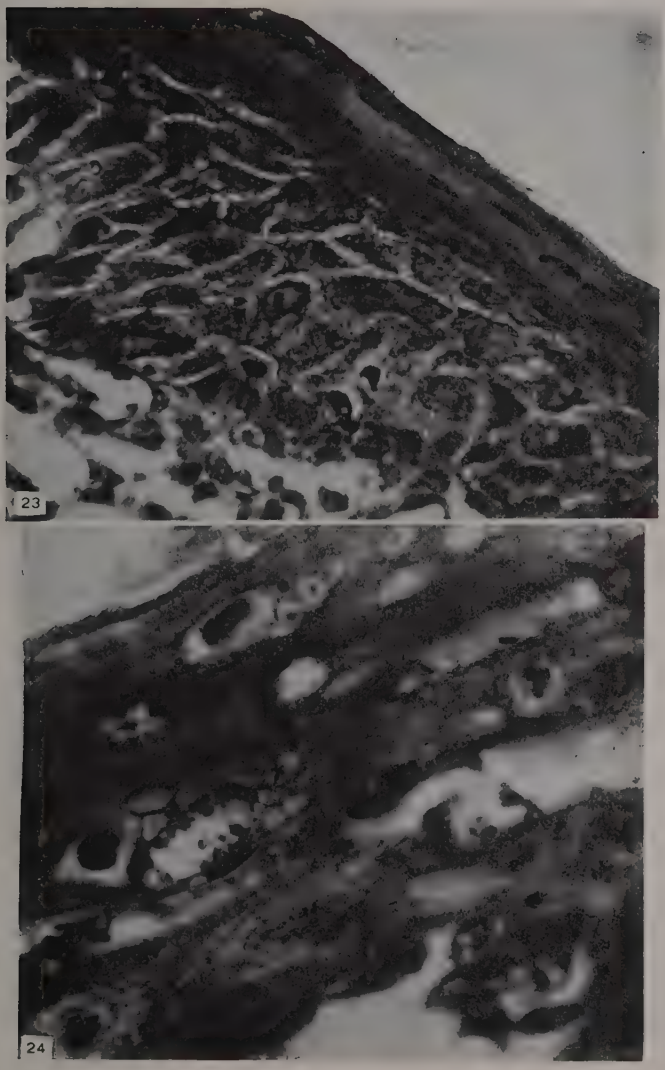


Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

ESTAMPA 6

Fig. 23 — Rhesus 3969. Corte do pólipo, mostrando o edema do epitélio (esponjiose) (aumentada 800x.).

Fig. 24 — Rhesus 3969. Corte do polipo mostrando na espessura do epitélio macrófagos contendo *Leishmanias* (aumentada 1100x.).

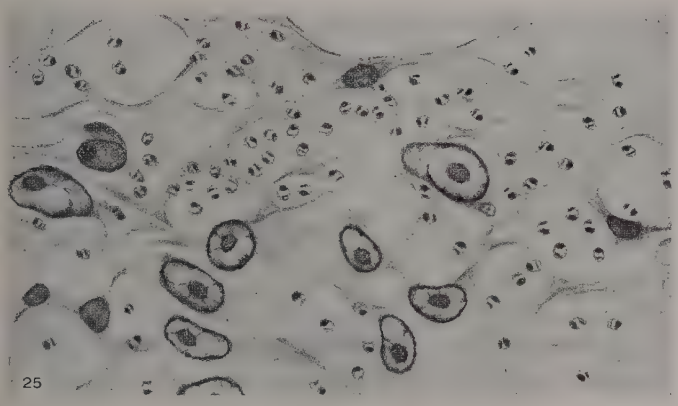


Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

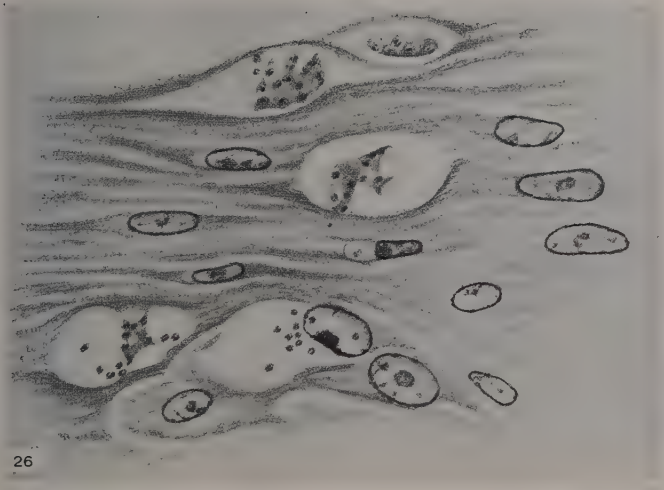
ESTAMPA 6

Fig. 25 — Rhesus 3969. Corte do pólido da narina com grande aumento mostrando as *Leishmanias*. Desenho de A. Leal (aumentada 1700x.).

Fig. 26 — Rhesus 3969. O mesmo corte do desenho anterior mostrando macrófagos contendo *Leishmanias* no interior do epitélio. Desenho de A. Leal (aumentada 900x.).



25



26

Da Cunha: Infecções experimentais na leishmaniose tegumentar americana

Sôbre a hiperplasia celular no mixoma infectuoso do coelho (*)

por

C. Magarinos Torres

(Com 41 figuras no texto)

Um dos pontos controversos, na literatura sôbre mixoma infectuoso do coelho, é o do aumento numérico de células, nas respectivas lesões.

Findlay (1929) informa: "There is no apparent increase in the number of the connective-tissue cells... The nodular lesions are thus due, not to an active proliferation of the tissue elements as in the Rous sarcoma or fowl pox, but simply to the myxomatous changes in the tissues."

Rivers (1930) diz: "The evidence obtained from my work is convincing that both growth and destruction of tissue occur in the disease."

Hurst (1937) assevera: "In some places, especially at the margins of a lesion, there was diffuse increase of cells, at most a 2- or 3-fold increase over the number ordinarily present. Few of these had the appearance of elements normal to the skin; they included myxomacells derived from the local conneective-tissue cells, large rounded cells of macrophage type, and a variable number of polymorphonuclear leucocytes, many karyorrhetic, wich were probably more numerous at an earlier stage."

Procuramos focalisar, de modo especial, essa questão, ao estudarmos material histologico gentilmente cedido pelo Dr. H. de Beaurepaire Aragão.

O vírus usado vem sendo mantido, no Instituto Oswaldo Cruz, ha vários anos, por passagens sucessivas, no coelho doméstico. A maneira habitual de inoculação é por escarificação da pele do dorso do animal, previamente raspada, consistindo o material infectante, em fragmentos recentemente retirados, de lesões cutâneas. Ocasionalmente são, ainda, usadas, a inoculação na conjuntiva intacta, e a via intraperitoneal.

Recebido para publicação a 30 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

As nossas observações são fundamentadas em preparados histológicos provenientes de 22 coelhos domésticos inoculados experimentalmente, fixados os diversos tecidos em líquido de HELLY e no formol a 10%, incluidos em parafina, corados pela hematoxilina-eosina. Fragmentos delgados retirados de lesões mixomatosas de alguns animais, sacrificados na ocasião, foram fixados nos liquidos B-15 e P.F.A.-3 (modificações do fixador de BOUIN, introduzidas por ALLEN), sendo os córtes histológicos corados pela hematoxilina férrica.

Notámos que as lesões cutâneas do mixoma, que sobrevem fóra dos pontos em que foi praticada a inoculação, apresentam duas fases principais, com características histológicas diversas, o que, possivelmente, explica, até certo ponto, a divergência de opinião dos autores.

Em uma fase, mais atrazada, os processos se traduzem por hiperemía, edema, intensa hiperplasia das chamadas "myxoma-cells", alterações dos finos vasos sanguíneos, hemorrhagias e infiltração por leucócitos heterófilos, na derma, associados a alterações degenerativas peculiares, na epiderme e seus anéxos.

Em outra fase, adiantada, o quadro microscópico é dominado pela aparição de material amórfo, intensamente corado em azul, nas preparações pela hematoxilina-eosina, e pela necróse extensa de celulas, na derma. Nesse período, a derma, nas lesões do mixoma, encerra, visivelmente, menor número de células que o tecido normal.

Para observação do fenômeno de hiperplasia célular é necessário, assim, que se examine as lesões nas quais a mencionada substancia intercelular basófila, seja escassa. Segundo nossa experiência, essa fase favorável é encontrada nas lesões metastáticas da conjuntiva palpebral, examinadas dois a três dias após o seu início, quando a inflamação purulenta, que mais tarde se desenvolve, é pouco evidente, macroscópicamente.

A figura 2 ilustra a acentuada riqueza em células, na derma, em lesão de mixoma, quando comparada com a figura 1, que representa a derma de um coelho normal, na mesma região. As células são, em sua maioria, as chamadas "myxoma-cells", representando os fibrocitos, as células da adventícia dos vasos sanguíneos e os macrófagos da derma, a sua fonte de orígem mais provavel.

Tal como acontece nos músculos estriados, e em outros tecidos do embrião da galinha (STOUGH, 1931), o aumento numérico das células, nas lesões do mixona, não pode ser explicado pela multiplicação indireta (cariocinese) de tais elementos, visto como, geralmente, nenhuma figura de mitose é encontrada, em exame microscópico demorado. A mesma opinião sustenta

FINDLAY (1929), quando diz: "... even in early stages of the lesions it is by no means easy to discover even a single connective-tissue cell in mitotic division".

As observações que fizemos levaram-nos à conclusão de que o aumento numérico das chamadas "myxoma-cells", é o resultado de uma mitose alterada, durante a qual a membrana nuclear permanece conservada, não havendo formação de spirema, fuso acromático, centrosomo e àster.

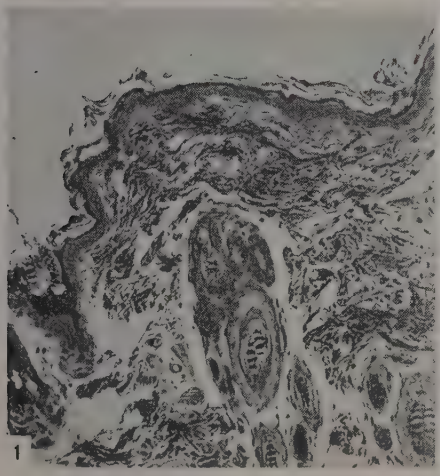


Fig. 1

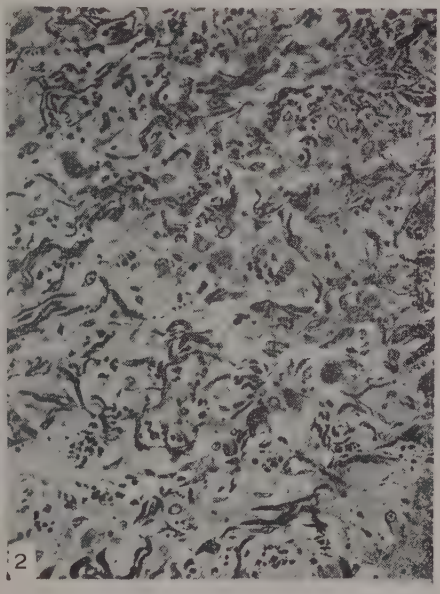


Fig. 2

Esperamos que estudos citológicos posteriores venham esclarecer quais as relações que tal processo apresenta com a verdadeira amitose, com a "pseudo-amitose" e condições afins ("modified mitosis"). E' bem conhecida a dificuldade, na identificação e interpretação de tais processos, e disso dá uma idéia fiel, a excelente exposição de WASSERMAN (1929), no Tratado de Anatomia Microscópica do Homem, de MÖLLENDORF.

FIBROCITOS, MACRÓFAGOS E "MYXOMA-CELLS" DA DERMA

São os fibrocitos, macrófagos e as chamadas "myxoma-cells" da derma, os elementos nos quais, possivelmente, em melhores condições, poderão ser apreciadas as modificações peculiares das quais nos vamos ocupar.

Várias circunstâncias para tal concorrem.

Uma delas, é a situação isolada das células, o que corresponde, quase, à vantagem de se trabalhar com células dissociadas, certamente com células libertas da condição de lementos intimamente agregados para a constituição de um tecido.

Outra circunstância favorável, é a de serem, tais èlementos, no mixoma infectuoso, os que mais ativamente são atingidos pelo processo de hiperplasía.

Preferimos descrever, simplesmente, os aspectos notados, baseando-nos em documentos fotográficos não retocados.

Necessariamente a interpretação de tais aspectos será uma tentativa, sujeita, portanto, a crítica e reinterpretação, cabendo, assim, melhor, no capítulo reservado à discussão.

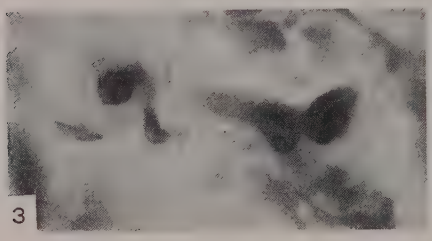


Fig. 3

Fig. 4

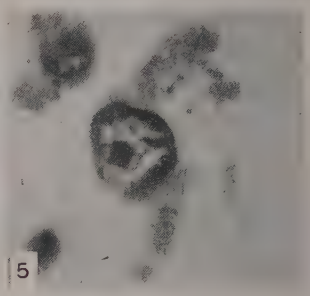


Fig. 5

A fig. 4 mostra um fibrocito dá derma, em lesão do mixoma, em fase inicial de hipertrofia. Conserva estrutura nuclear, aparentemente normal, conforme se verifica, comparando-o com a fig. 3, a qual representa células da derma, de um coelho normal. O nucleolo, na porção central do nucleoplasma, é circundado por grânulos de cromatina, dispondo-se, outros, ao longo de delicado retículo de linina. Membrana nuclear nítida, de contornos regulares; forma do núcleo, elíptica.

A fig. 5 corresponde a fase mais adiantada de hipertrofia de um fibrocito da derma, em lesão do mixoma; núcleolo volumoso; grânulos de cromatina maiores que os da fig. 4; membrana nuclear nítida; contornos do núcleo, irregulares.

A fig. 6 exemplifica uma "myxoma-cell" típica, revelando considerável aumento do tamanho do núcleo e do citoplasma, em relação a uma célula da derma normal (fig. 3); necleolo volumoso, de encontro ao qual se aplicam

massas de cromatina ; nucleoplasma ocupado por retículo de linina contendo grânulos de cromatina, de dimensões e forma variadas, pouco diversas das do núcleo normal ; membrana nuclear nítida ; núcleo elíptico.

Na "myxoma-cell" da fig. 7, as massas de cromatina, mais volumosas que o normal, sobresáem em nucleoplasma clarificado, onde existe, além disso, delicado retículo de linina.

A "myxoma-cell" vista na fig. 8, mostra um núcleo oval, no qual a cromatina constitue massas compactas, impregnando um reticulo de linina, mais conspícuo que nas duas figuras precedentes.

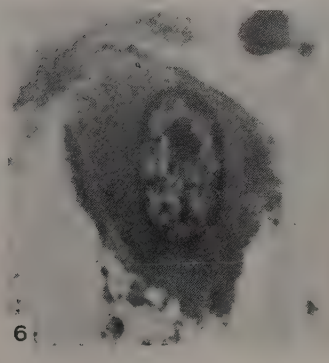


Fig. 6

Fig. 7

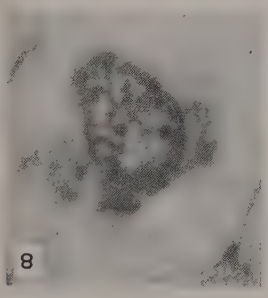


Fig. 8

Na fig. 9, o nucleoplasma da "myxoma-cell", contém maior número de estruturas que as das tres figuras precedentes, sendo, como que, clarificado. Além de massas compactas de cromatina, nele se vê um retículo grosseiro, impregnado de cromatina (esboço de spirema). Membrana nuclear, reconhecível. Nucleolo volumoso.

A "myxoma-cell" representada na fig. 10, possue nucleolo volumoso, alongado, e área mais ou menos extensa, de nucleoplasma clarificado. Massas de cromatina e retículo de linina, desenvolvidos na vizinhança da membrana nuclear, bem conservada. Estrictura do núcleo, esboçado, em um dos polos.

Na "myxoma-cell" da fig. 11, vê-se repartição sensivelmente igual da cromatina, na zona do suco nuclear sob a forma de massas compactas, impregnando um reticulo de linina. Membrana nuclear nitida. Núcleo ovoide.

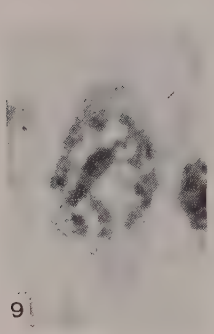


Fig. 9

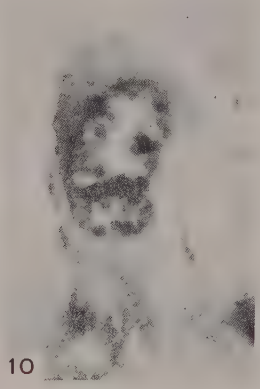


Fig. 10

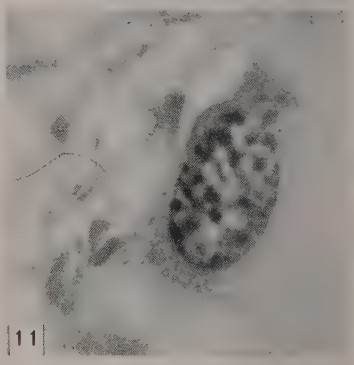


Fig. 11

Vê-se, na fig. 12, a cromatina sob a forma de massas irregulares, não homogêneas, parecendo constituidas por partículas menores, intimamente juxtapostas ("mulberries"), sensivelmente maiores que as representadas na fig. 11, em núcleo de "myxoma-cell", seccionado transversalmente. Clarificação do núcleoplasma. Nucleolo volumoso, alongado. Membrana nuclear, apenas reconhecível.

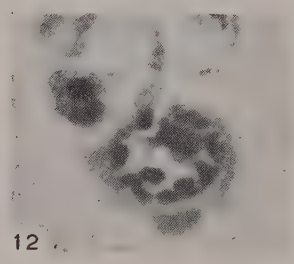


Fig. 12

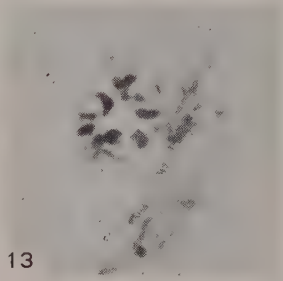


Fig. 13

Fig. 14

Na "myxoma-cell da fig. 13, as volumosas massas de cromatina, com dimensões semelhantes, apresentam-se esparsas, no núcleoplasma clarificado. Membrana nuclear, apenas perceptível.

A fig. 14 representa córte transverso de núcleo de "myxoma-cell". Massas de cromatina, sensivelmente iguais, dispõe-se de encontro á membrana nuclear, algumas, mesmo, impregnando esta estrutura, fazendo con-

traste com a porção central, clarificada, da zona de suco nuclear. Em algumas, nota-se constituição heterogênea (porções mais cromófilas que outras).

A "myxoma-cell" de grandes dimensões, ilustrada na fig. 15, revela conservação perfeita de finos detalhes estruturais, tal como em um núcleo em repouso. A cromatina, sob a forma de finos grânulos, distribui-se ao longo

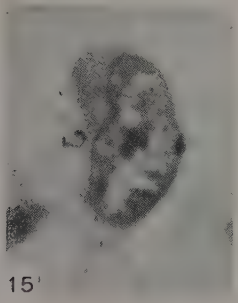


Fig. 15

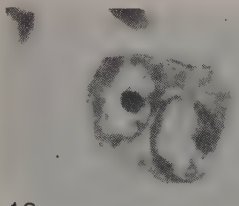


Fig. 16

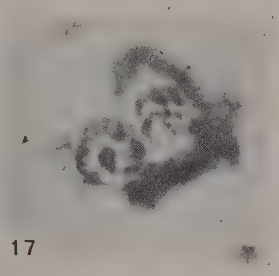


Fig. 17

de delicado reticulo de linina. Nucléolo de volume normal, em relação ao núcleo considerado. Membrana nuclear nitida. A estrictura núclear é esboçada, em um dos pólos.

Na fig. 16, está representada uma célula da derma, em lesão de mixoma, contendo dois núcleos em repouso.

Fig. 18

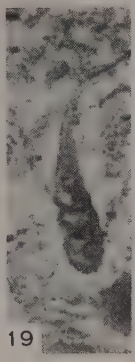


Fig. 19

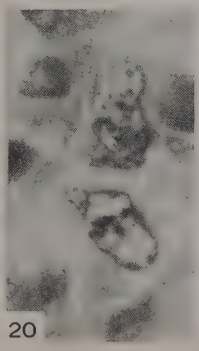


Fig. 20

A fig. 17 ilustra a divisão do citoplasma que acompanha a divisão nuclear, em célula da derma, em lesão de mixoma.

Na fig. 18 vê-se célula da derma, em lesão de mixoma, na qual a cromatina está condensada em duas massas únicas ("mulberries"?), lembrando

aspectos representados por Stough (1931) no mesenquima do embrião de galinha, como "modified mitosis". Estrictura do núcleo, em sua porção mediana.

A fig. 19 corresponde a uma célula da derma, em lesão de mixoma, contendo quatro núcleos, enfileirados, de dimensões, progressivamente, menores.

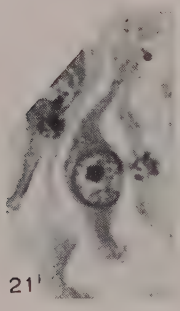


Fig. 21

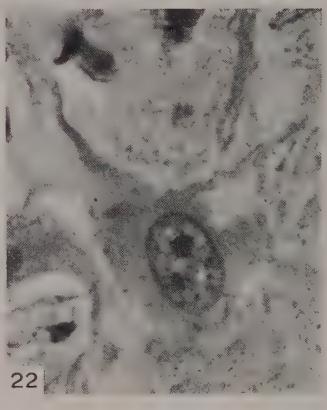


Fig. 22

Na fig. 20, os núcleos de duas células da derma, em lesão de mixoma, mostram a formação de brôtos.

Na fig. 21 é representada uma célula da derma, em lesão de mixoma, com dimensões e estrutura semelhantes às de um fibrocito normal. Em rela-

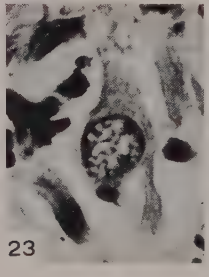


Fig. 23

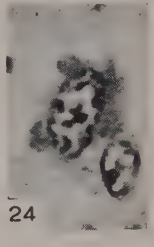


Fig. 24

ção a esta, a célula ("myxoma-cell") da fig. 22, mostra considerável hipertrofia do citoplasma e do núcleo, notando-se perfeita conservação dos finos detalhes, lembrando o núcleo, o de uma célula em repouso.

Na fig. 23, a cromatina impregna um reticulo grosseiro, quasi um cordão contínuo (esboço de spirema?), em célula da derma, na lesão de mixoma. Clarificação da zona de suco nuclear. Membrana nuclear nitida.

Clarificação do núcleoplasma, e condensação da cromatina em massas aparentemente formadas por particulas menores, aglutinadas, vê-se na cé-

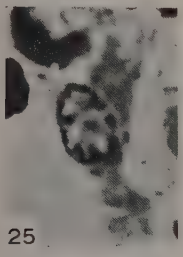


Fig. 25

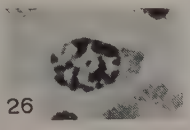


Fig. 26

Fig. 27

lula da fig 24, também elemento da derma, em lesão de mixoma. Membrana nuclear conservada.

A fig. 26 mostra célula da derma, em lesão de mixoma, com hipercromatose da membrana nuclear e do reticulo. Essas mesmas modificações são aparentes na fig. 26. Nela, o detalhe mais interessante, consta do aspecto he-

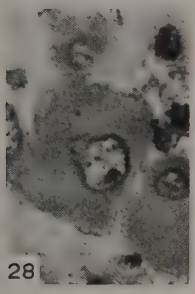


Fig. 28

Fig. 29

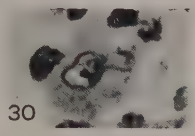


Fig. 30

terogêneo das massas de cromatina. Em duas delas, aparecem dois bastonetes marginais (cromosomos?), separados por estreita faixa menos intensamente corada.

Na fig. 27, existe disposição marginal das massas de cromatina, formadas por particulas menores aglutinadas, e clarificação da porção central do nucleoplasma.

Fig. 31 Fig. 32

Nas figs. 28, 29 e 30, vemos formação de brôtos, no núcleo de células da derma, em lesão de mixoma.

Outros aspectos que, como estes, imitam a amitose, são representados nas figuras 31 e 32, correspondendo a células da derma, em lesão de mixoma, com estrictura do núcleo.

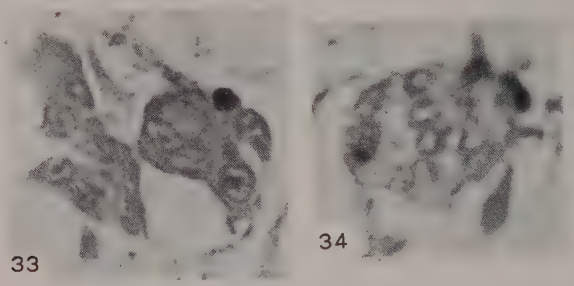


Fig. 33 Fig. 34

Também, na lesão de mixoma, não são raras células multi-nucleadas ou massas sinciciais (figs. 33 e 34).

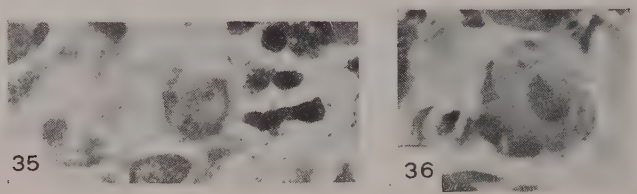


Fig. 35 Fig. 36

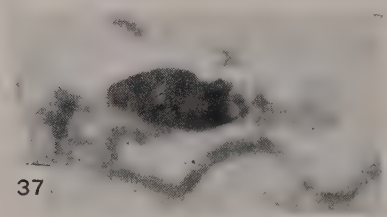
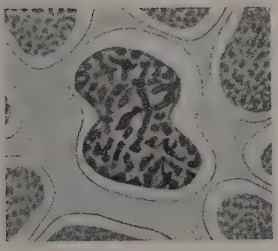


Fig. 37

Ao lado de grande número de células, com as modificações acima relatadas, aparecem outras, relativamente pouco numerosas (figs. 35, 36 e 37), com necrose (picnose, cariorrexis e cromatolise).



38

Fig. 38

39

Fig. 39

A fig. 38 representa a pseudoamitose em célula epitelial da córnea de *Salamandra maculosa,* segundo G. Politzer (1924).

A fig. 39 ilustra a amitose em células do mesenquima do embrião de coelho, segundo A. Maximow (1908).

40

Fig. 40

A fig. 40 reproduz desenhos, com câmara clara, da "modified mitosis", no embrião de galinha, segundo H. B. STOUGH (1935).

A fig. 41 demonstra fases diversas de "Karyorrhexis", em células epiteliais do rim, segundo H. SCHAMAUS & E. ALBRECHT (1895).

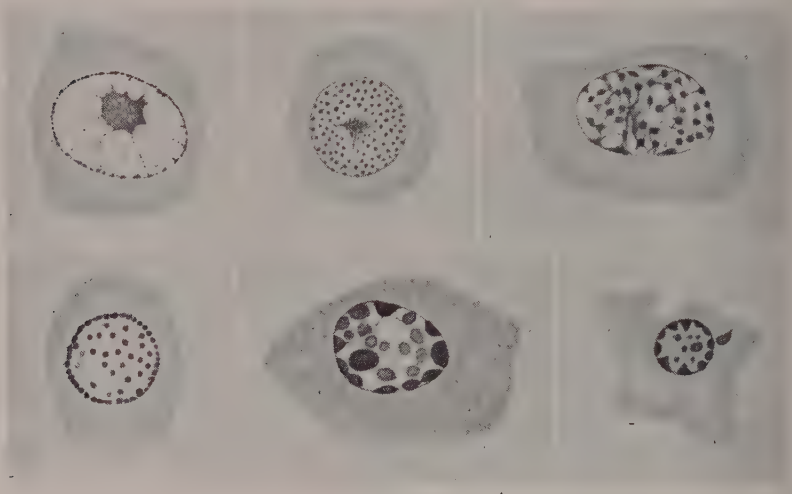


Fig. 41

DISCUSSÃO

No consenso geral, a amitose é um processo de rara ocorrência, e que tem sido, mais de uma vez, confundido com a mitose que apresenta alterações mais ou menos consideráveis, em seus aspectos mais típicos.

DARLINGTON (1937) diz: "Amitosis, the division of a nucleus without the separation of chromatids, is found only in short-lived tissues, such as the endosperm of seed-plants and the deciduous embryonic membranes of animals when it is frequently unaccompanied by cell-division. It does not therefore give rise to independent and equivalent daughter-nuclei."

WILSON (1937) menciona:"... amitosis is a secondary and simplified type that is an accompaniment of extreme specialization, and is commonly a symptom of approaching degeneration and death."

Anormalidades na mitose, podem afetar o número de cromosomos. "Reduplication of some of the chromosomes of a set beyond the normal diploid number is called *polysomy*, reduplication of the whole set so that the nucleus

contains three, four or more sets is called *polyploidy*." (DARLINGTON, 1937). DARLINGTON menciona outras informações que se prendem ao assunto, as quais transcrevemos, a seguir: "Particular chromosomes, especially very small ones, sometimes fail to divide regularly at mitosis; both halves pass to the same pole, so that nuclei with variable numbers arise... The callus tissue developed round wounds by some of the higher plants is particularly liable to such abnormalities. Double nuclei have been found in the callus of a haploid tomato by LINDSTROM and KOOS (1931), and in this way tetraploid, octoploid and other abnormal nuclei may arise in the diploid... Poisoning and ill-treatment of various kinds have been used to induce doubling of the chromosome number in root-tips (cf. DE MOL, 1921; MEMEC, 1929) ... In tissues in which polyploid nuclei have arisen, these nuclei have been observed to divide by multipolar mitoses. A spindle is then formed with three or four poles, as in a doubly fertilised echinoderm egg, and the chromosomes are distributed at random to these poles. This has been found both where the polyploid cells were developed in galls and following chloralisation. The result is the production of nuclei with chromosome numbers once more reduced (MEMEC, 1926, 1929)."

As referências acima são feitas com o intuito de recordar a influência que condições desfavoráveis do meio, especialmente as tóxicas, podem exercer sôbre a divisão mitótica normal, tornando-a anormal. A citação seguinte, reforça o que ficou dito: "The commonest type of breakdown in mitosis is the failure of two nuclei to be formed at anaphase or their fusion at telophase to give a fusion nucleus with double the ordinary number of chromosomes. This abnormality has been described in relation to the origin of polyploidy. We have seen that it is conditioned by an abnormal environment, by injury, and so forth, as a rule." (DARLINGTON, 1937).

Diversos pesquisadores, ao estudarem o desenvolvimento do embrião de galinha, notaram a discordância entre o rápido crescimento dos tecidos, e o número relativamente pequeno, de figuras de mitose encontrado.

STOUGH (1931) diz: "The writer has long been puzzled in the attempt to account for the rapid growth of the chick embryo through ordinary mitotic cell division. The number of mitosis present seems entirely inadequate to provide for the development of the various organs."

Um processo de multiplicação célular, referido como amitose, foi descrito por CHILD (cit. por WASSERMANN), no embrião de galinha, por PATTERSON (1908), no embrião do pombo, e por MAXIMOW (1908), no embrião do coelho (fig. 39.)

Estudos posteriores, porém, esclareceram que, em alguns de tais casos, não se tratava de uma verdadeira amitose, cuja caracteristica principal é a

de se realizar independentemente da formação de cromosomos, mas sim de pseudoamitose. A seu respeito, WASSERMANN (1929) informa: "Bei dieser Störung des Mitoseablaufs, welche zuerst von HAECKER (1900), später von SCHILLER (1909) an Copepodeneiern nach Äthernarkose beobachtet und neurdings von ALBERTI und POLITZER (1924) und von POLITZER (1924) an *Salamander* — larvenzellen nach der Einwirkung von Röntgenstrahlen und von chemischen Agenzien genauer studiert worden ist, kommt es während der Anaphase zur Verklumpung der Enden der gegenpoligen Chromatinschleifen und dadurch zu chromatischen Verbindungsbrücken zwischen den Tochtersternen und Tochterkernen (Abb. 385). Es ist klar, dass hierdurch nur eine äusserliche Ähnlichkeit mit der Amitose hervorgebracht wird, denn die Pseudoamitose ist eine echte gestörte Mitose..."

Em relação ao que se observa nos tecidos do embrião de galinha, STOUGH (1931) assim se expressa: "There can be no serious question in the mind of anyone who has devoted sufficient effort to the material such as the writer has studied as to the fact that there is found here a method of nuclear division and that it is not typical mitosis. It is impossible to break the process up into the usual "phases" such as are used in describing mitosis. No prophase with a spireme is present, and if there is a resting stage, it consists merely of that period when the nucleus contains only one mulberry. An attempt has been made to show on the basis of the highly probable presence of discrete chromosomes and of spindle fibers that this is not amitosis, but more akin to mitosis."

A êsse propósito, GATES (1942) assim se expressa: "Perhaps this phenomenon can be interpreted in the following way. The chromosomes are so small because they lack a sheath and are reduced to the essential genic materials of the threads in the resting nucleus. There being no sheath or matrix to the chromosomes, no nucleoli are formed in telophase and the whole nucleolar cycle is omitted... ...On the whole, it seems more likely that all the chromosomes are represented, but reduced to their lowest terms. i. e., stripped of everything except their genic materials."

Outro resumo da "modified mitosis", é apresentado por STOUGH (1935), em trabalho posterior: "Modified mitosis is primarily a nuclear phenomenon. Metaphases, with their conspicuous arrangements of chromosomes are not present. Neither can centrosomes be found. Instead, the chromatin, in the form of a conspicuous, deeply staining nucleolus-like structure elongates, constricts to form a dumbbell shape, and finally pulls apart, into two masses. These latter, since they appear not to be homogeneous but to be composed of small particles closely clumped, have been called "mulberries". Between these may be seen structures which may represent remnants of spindle fi-

bers. Following chromatin division a very fine membrane or nuclear plate may be seen forming which later divides the nucleus into two daughter nuclei. Very rarely has constriction been observed taking the place of nuclear plate formation. During this entire process the nuclear membrane does not desintegrate as in typical mitosis. In non-syncitial tissues division of the cytoplasm following division of the nucleus has been demonstrated".

Várias semelhanças encontrámos entre o processo descrito, por STOUGH, como "mitose modificada", nas células do embrião de galinha, e o de mitose alterada, por nós assinalado, em células da derma, nas lesões de mixoma, esta última, provavelmente, na dependência de condições tóxicas locais.

Em ambos, trata-se de um fenômeno, primariamente, nuclear. Em ambos, não existe uma metafase, com arranjo conspícuo de cromosomos. Em ambos, a cromatina se condensa em massas conspícuas, de contornos irregulares (chamadas "mulberries", por STOUGH), constituidas por partículas menores. Em ambos, a membrana nuclear permanece reconhecivel, durante toda a duração do fenômeno. Em ambos, as fases finais simulam a amitose.

Comtudo, exame detalhado mostra que não se trata de processo idêntico, sendo fácil verificar, entre êles, diferenças sensiveis. As mais evidentes são as seguintes: nas células da derma, nas lesões de mixoma, o fenômeno é precedido de notável hipertrofia do núcleo e do corpo célular; a condensação da cromatina, em tais núcleos hipertrofiados, não se efetúa em uma única massa (ou "mulberry"), mas em múltiplas massas, as quais mostram, claramente, uma constituição heterogênea (porções mais intensamente cromofilas, por vezes com a forma de bastonetes (fig. 26), e substância de união, menos cromofila); precedendo a constituição de massas cromáticas heterogêneas, a cromatina dispõe-se em traves mais grosseiras que as do núcleo em repouso, o que corresponde a um esboço de formação de spirema (fig. 9, 23).

Interpretamos, da maneira abaixo mencionada, os fenômenos que observamos nas lesões cutâneas de mixoma: em determinado período evolutivo, verifica-se hiperplasia evidente das chamadas "myxoma-cells", cuja origem reconhecida são os fibrocitos, as células da adventicia dos vasos sanguíneos e os macrófagos da derma.

Em contraste com tal hiperplasia nítida (fig. 2), nota-se escassês extrema, não raro, ausência completa de figuras de mitose. Ao contrário, não são raras células com dois núcleos (fig. 16), células multinucleadas (figuras 19, 33, 34), já mencionadas por RIVERS (1930), e outras com formação de brôtos (figs. 20, 29, 30) e estrictura (figs. 31, 32) do núcleo, aspectos tais que simulam a amitose. As células, grandemente aumentadas de volume, apresentam modificações peculiares de sua estrutura nuclear; a cromatina

(figs. 9, 23) condensa-se em grosseiro reticulo (esboço de spirema), e em massas volumosas. Esta última modificação não atinge, simultaneamente, a totalidade da cromatina. Assim, ao lado das massas resultantes da condensação da cromatina, o nucleoplasma mostra, ainda, em certas zonas, um reticulo, mais grosseiro de que o do núcleo em repouso (fig. 7).

Em fase mais adianta, a totalidade da cromatina condensa-se em massas irregulares (fig. 12), constituidas por porções mais intensamente cromofilas (figs. 13, 14), algumas vezes (fig. 26) com a forma de bastonetes (cromosomos libertos de todos os seus invólucros, "stripped of everything except their genic materials"?). Alguns núcleos, em cortes transversos (figuras 14, 27) revelam disposição das massas de cromatina, na vizinhança da membrana nuclear, ao passo que a porção central do nucleoplasma apresenta-se clara, desprovida de cromatina (aspecto traduzindo processo degenerativo que atinge tais elementos em via de divisão?).

A membrana nuclear permanece reconhecivel, em todas as células consideradas (figs. 11, 14, 15, 20, 23, 27). A forma do núcleo sofre modificações. Esférica ou elipsóide, de um modo geral, em núcleos com a cromatina sob a fórma de finos grânulos (figs. 4, 21), torna-se ovóide (fig. 8), nos núcleos com formação de massas cromaticas heterogêneas. Acentuando-se a forma ovóide, onúcleo apresenta duas extremidades de volume desigual (figs. 7, 8, 10, 11, 15). Núcleos filhos originam-se, orapor formação de brôtos (figs. 20, 28, 29), ora por estrictura (figs. 15, 31, 32) do núcleo primitivo, dando lugar a aspectos que aparentam a amitose. Algumas vêzes, em células que não sofreram hiperplasia, a condensação da cromatina faz-se em duas massas únicas (fig. 18), as quais, progressivamente, afastam-se entre si, constituindo-se novos núcleos, pela formação de placas em relação com a membrana nuclear, fenômeno em todos os pontos semelhante ao descrito por STOUGH, nas células do embrião de galinha.

A separação completa dos núcleos dá lugar á aparição de células binucleadas (fig. 16) e multinucleadas (figs. 19, 33, 34). A separação dos corpos celulares (fig. 17) completa a divisão célular por êsse processo, o qual semelha a pseudo-amitose.

A primeira impressão que tivemos, estudando as modificações que acabamos de mencionar, nas células da derma, em lesões de mixoma, foi a de que estivessem na dependência de um processo de necrose, com decurso particularmente lento. Essa é, de fato, a interpretação que lhes dá HURST (1937), o autor que nos parece ter dado a melhor descrição microscópica das lesões. Eis as suas palavras: "Not infrequently the myxoma-cells presented evidence of degeneration. The chromatin of their large vesicular nuclei became condensed to a number of a large, deeply-staining blocks, and

with the disappearance of its membrane the nucleus became fragmented. This sequence of changes from a nucleus with finely-divided chromatin, through a more vesicular stage in which staining was deeper, to a stage of chromatin fragmentation and ultimate desintegration, was very common in all situations where the peculiar hyperplasia of cells characteristic of the action of the virus was encountered, and the later stages will in future be referred to simply as nuclear degeneration".

No trabalho clássico de SCHMAUS & AABRECHT (1895), sôbre cariorrexis apreciada em células do rim submetidas à necrose por isquemía, encontrámos, nas figs. 2, 3a, 8, 9, 17, 18 e 25, aspectos referentes a hipercromatose da membrana nuclear ("Kernwandhyperchromatose") e do reticulo ("Gerüsthyperchromatose") lembrando os vistos no mixoma.

Estudo mais demorado, porém, convenceu-nos de que as células com hipercromatose nuclear, em lesões de mixoma, em grande parte não são elementos em via de necrose. Mostrando-se tão difundidos, tais aspectos, seria de esperar que fossem bem mais numerosos do que o são, fases mais adiantados do processo, comparáveis às representadas por SCHMAUS & ALBRECHT 1895, nas suas figs. 27, 28, 31, 32 e 38, nas quais não mais se reconhece a membana nuclear, e que são, por eles, referidas nos seguintes têrmos : "Mit der Chromatinumlagerung und-Zelltheilung geht ein Verlust der Kernfärbbarkeit einher, welcher wahrscheinlich auf Auslaugung der vor oder nach dem Absterben in ihrer chemischen Zusammensetzung veränderten chromatischen Substanz durch die durchtränkende Flüssigkeit deruht." Outra razão para não considerá-las como pertencendo a um processo de necrobiose e necrose, está na preservação de detalhes finos da estrutura nuclear, apreciável, vantajosamente, em material fixado no B-15 e P.F.A.-3, corado pela hematoxilina férrica ; a membrana nuclear e o reticulo de linha impregnado de cromatina (esboçando o spirema, em alguns elementos), conservam afinidade normal para com os corantes; nas massas de cromatina condensada, percebe-se a existência de estruturas em faixa ou bastonete (cromosomos?), corados intensamente, contrastando com porções menos cromofilas.

Outra hipótese a considerar, é a de corresponderem, as modificações encontradas no mixoma, a mitoses abortivas, tão freqüentes nos blastomas malignos.

De certo modo, contraria tal hipótese, o fato das mitoses abortivas aparecerem, freqüentemente, associadas à degenerescência do citoplasma, levando em conta a abalizada opinião de PIANESE (1895). Nos fibrocitos com hipercromatose nuclear, ao contrário, o citoplasma mostra afinidade normal para com os corantes, e o elementos celular, de modo algum, sugere uma

célula com degenerescência ou necrose. Também, na mitose abortiva, verifica-se o desaparecimento da membrana nuclear, tal como exemplifica a figura VII, da Estampa II, de PIANESE (1895), ao passo que nos fibrocitos da derma, em lesões de mixoma, a membrana nuclear persiste em todas as curiosas modificações do conteúdo nuclear sobrevindas.

Tudo nos leva a crer que a divisão mitotica alterada, que acabámos de referir, nas lesões cutâneas de mixoma, esteja na dependencia do meio ambiente anormal em que se encontram os fibrocitos, macrófagos e células da adventícia dos vasos sangüíneos, onde estão submetidos a uma dupla ação do vírus, estimulante, da qual resulta a sua hiperplasia, e tóxica.

CONCLUSÕES

Existe nítida hiperplasia de células dérmicas (fig. 2, comparada com a fig. 1), nas lesões cutâneas do mixoma infectuoso do coelho, quando examinados fragmentos nos quais a substância intercelular basófila, é pouco abundante.

Condiciona, tal hiperplasia, um processo de divisão célular (mitose alterada), com caracteristicas que a aproximam da pseudoamitose.

Os novos núcleos originam-se à custa dos núcleos primitivos, ora pela formação de brôtos (figs. 20, 28, 29, 30), ora pela sua estrictura (figs. 18, 31, 32). A divisão do citoplasma completa a divisão do núcleo (figs. 16, 17), conduzindo, assim, ao aumento númerico das células. Outras vezes, a divisão nuclear não é seguida de divisão imediata do citoplasma, dando origem a células gigantes multinucleadas, ou massas sinciciais (figs. 33, 34).

A conservação da membrana nuclear, durante todas essas modificações, constitui detalhe caracteristico do processo mencionado.

Figuras de mitose típica, são, praticamente, ausentes.

Nas lesões de mixoma, as células da derma com hiperplasia mostram modificações em suas dimensões, forma e estrutura, constando de aumento considerável de volume (hipertrofia), tanto do núcleo, como do citoplasma (figs. 6, 7, 8), modificação da forma do núcleo (figs. 8, 10, 15), hipercromatose do retículo de linina (esboço de spirema? figs. 9, 23), aumento da quantidade e condensação da cromatina em massas ("mulberries"?) com estrutura heterogênea (bastonetes cromofilos, cromosomos?, e porção intermediaria menos cromófila (figs. 13, 14, 26), clarificação do núcleoplasma (figs. 12, 13, 14, 24, 26, 27).

Embora seja provável que alguns dêsses aspectos correspondam a necrose das células, com alterações nucleares do tipo da cariorréxis, tal como afirmam quase todos os autores que se ocuparam do assunto, é possível que outras representem fases mal conhecidas do processo de mitose alterada (pseudo-amitose) aqui relatado. Com efeito, finos detalhes de estrutura, os quais não são, ordinariamente, encontrados em células necrosadas (figs. 35, 35, 37), puderam ser evidenciados em material submetido à técnica citológica adequada (fixação no B-15 e P.F.A.-3, coloração pela hematoxilina ferrica).

SUMMARY

Definite hyperplasia of cells occurs in the skin lesions of the infectious myxoma of rabbits, more visible in such stages in which the intercellular basophilic substance is rather scanty (fig. 2).

The increase in number of cells is the result of simplified forms of mitosis (modified type of mitosis, pseudoamitosis) which might readily be mistaken for amitosis in their final stages. Budding (figs. 20, 28, 29, 30) as well as constriction of the nucleus (figs. 18, 31, 32), and the formation of giant-cells (figs. 33, 34) are not rare. During the entire process the nuclear membrane does not desintegrate as in typical mitosis. Division of the cytoplasm following division of the nucleus has been demonstrated (fig. 17).

Typical mitosis is practically absent.

The cells which undergo hyperplasia present remarkable changes in their dimension, shape, and structure. The nucleus and cell-body are considerably enlarged (figs. 6, 7, 8). The shape of the nucleus is modified (figs. 8, 10, 15). Hypertrophy of nuclein, either as an intranuclear network (spireme?, figs. 9, 23), or in the form of conspicuous, deeply staining masses which appear not to be homogeneous but to be composed of small particles closely clumped ("mulberries"?, figs. 12, 13, 14, 25, 26) occurs in most cells.

While some of these pictures are probably related to necrosis of the cells as stated by most of the previous workers, it is likely that some of them may represent developmental stages of the modified mitosis (pseudoamitosis) here reported. In fact, fine cytological details not ordinarily preserved in necrotic cells (figs. 35, 36, 37) may be demonstrated in the so-called myxoma-cells submitted to approved cytological methods of study (fixation in B-15 and P.F.A.-3, staining in iron-hematoxylin).

EXPLICAÇÃO DAS FIGURAS

As fotomicrografias 1 e 2, foram feitas com o aumento de 150 vezes; as 3-20 e a 37, com o de 1.500 vezes; às 21-36, com o de 660 vezes.

A fig. 1 representa a pele do dorso de um coelho normal, e a fig. 2, a derma, em lesão de mixoma, na mesma região, em fase em que a substância basofila intercelular é pouco abundante. Nela se nota evidente hiperplasia de células.

A fig. 3 representa macrófago e fibrocitos da derma, em coelho normal. As fotomicrografias 4-34, ilustram células da derma, em lesão de mixoma, evoluindo para constituirem as chamadas "myxoma-cells". A documentação ilustra a preservação de finos detalhes citológicos, em tais elementos, e a sua multiplicação por processo de mitose alterada, semelhando a pseudo-amitose.

As fotomicrografias 35-37, representam células da derma, em lesão de mixoma, com necrose (cariolise, picnose e cariorréxis).

As figs. 38-41, são desenhos copiando as figuras originais dos autores citados.

TRABALHOS CITADOS

DARLINGTON, C. D.
1937. Recent advances in cytology. Philadelphia, P. Blakiston's Son & Co.

FINDLAY, G. M.
1929. Notes on infectious myxomatosis of rabbits. Brit. jour. of Exp. Path., 10: 214-219.

GATES, R. R.
1942. Nucleoli and related nuclear structures. Botanical Review, 8:337-409.

HURST, E. W.
1937. Myxoma and the Shope fibroma. I: The histology of myxoma. Brit. Jour. Exper. Path., 18:1-14.

MAXIMOW, A.
1908. Über Amitose in den embryonalen Geweben bei Säugetieren. Anat. Anz., 33:89-98.

PATTERSON, J. Th.
1908. Amitosis in the Pigeon egg. Anat. Anz., 32 : 117-125.

PIANESE, G.
1896. Beitrag zur Histologie und Aetiologie des Carcinoms. Beit.z.path.Anat.u.z. allg.Path., Erstes Supplementheft, 1-193.

RIVERS, T. M.
1930. Infectious myxomatosis of rabbits. Jour. Exp. Med., 51 : 965-976.

STOUGH, H. B.
1931. Modified mitosis in the chick embryo. Jour. of Morph., 52 : 535-563.

STOUGH, H. B.
1935. Further studies in modified mitosis. Jour. of Morph., 58 : 221-256.

WASSERMANN, F.
1929. Die lebendige Masse *in* v. MÖLLENDORFF: Hand.d.mikr.Anat.d.Menschen, Bd. I/2.

WILSON, E. B.
1934. The cell in development and heredity. The Macmillan Co. New York.

Contribuição para o diagnóstico da Doença de Chagas pelas reações de imunidade (*)

I. Estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação do complemento

pelos Drs.

Julio Muniz e Gilberto de Freitas

(Com uma figura no texto)

O estabelecimento de um centro de estudos da doença de Chagas (*Trypanosomiasis americana*), pelo Instituto Oswaldo Cruz, na cidade de Bambuy, Estado de Minas Gerais, nos facilitou a obtenção de material abundante para um estudo comparativo do valor diagnóstico das diversas reações de imunidade nessa doença.

Neste primeiro trabalho iremos expor os resultados a que chegamos em relação às reações de fixação de complemento e aglutinação. Não exporemos aqui a revisão bibliográfica sôbre o assunto cujos dados figuram no final do nosso trabalho, o mesmo acontecendo em relação com as numerosas experiências que fomos obrigados a fazer com o fim de escolher entre as várias técnicas propostas, aquelas que êsses ensaios nos evidenciaram serem as que resultados mais constantes e seguro ofereciam.

Somos de opinião, em vista dos resultados já obtidos com estas reações no diagnóstico da *Trypanosomiasis americana*, que elas não devam constituir sòmente assunto de pura especulação científica mas passarem após uma necessária estandardização para o domínio dos trabalhos de rotina dos laboratórios clínicos, não só dos grandes como dos pequenos centros populosos do país, pois o estudo de tão importante endemia deve constituir preocupação constante não só dos higienistas como dos clínicos das regiões onde ela é encontrada.

(*) Recebido para publicação a 4 de setembro de 1944 e dada à publicidade em outubro de 1944.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Reação de fixação de complemento — Das reações sorológicas utilizadas para fins diagnósticos a única que tem sido mais estudada na *Tripanosomíasis americana* é a de fixação de complemento. Do seu valor falam os numerosos trabalhos publicados a respeito. Apesar disso ela ainda não se apresenta com as características de uma reação do tipo standard como devem ser tôdas aquelas de aplicação rotineira e isso é devido a não se ter ainda fixado qual dos antígenos até hoje estudados oferece resultados mais constantes e seguros. As numerosas técnicas que vem sendo propostas para o preparo dêsse componente, demonstram claramente êsse fato.

O primeiro antígeno usado foi o proposto por Guerreiro e Machado, em 1913, e era preparado com vísceras de animais jovens (Cão) intensamente infectados pelo *Schizotrypanum cruzi*. Tais antígenos que tiveram o grande mérito de demonstrar as possibilidades desta reação no diagnóstico da moléstia de Chagas foram quase completamente abandonados apesar de variarem as técnicas propostas par seu preparo, por não apresentarem estabilidade e serem dotados de um poder fixador muito variável, além de não possuirem características de especificidade devido à complexidade de sua composição. Antes do aparecimento do trabalho de Kelser várias tentativas foram feitas com o fim de utilizar culturas de *Schizotrypanum* no preparo de antígenos mas os resultados obtidos foram mediocres devido ao emprêgo de suspensões pobres de parasitas dada a dificuldade de obtenção de culturas abundantes com os meios então empregados para o seu cultivo. Em 1936 Kelser propôs uma nova técnica para preparo de um antígeno hidroglicerinado, partindo de culturas ricas obtidas por êle, utilizando o meio de Bonacci. Com êsse antígeno obteve Kelser ótimos resultados, trabalhando com soros de indivíduos portadores da doenças de Chagas, fáto êsse depois confirmado por outros pesquisadores utilizando a mesma técnica. Romaña e Dias em 1942 descreveram um processo para preparo de um antigeno alcoólico partindo de formas de culturas prèviamente tratadas com acetona. Recentemente em 1943, Davis utilizando como conservador uma solução de mertiolato a 1/10.000 em soluto fisiológico, propôs uma nova técnica para o preparo do antígeno, partindo de culturas obtidas no meio de Bonacci e que são submetidas à ação de baixa temperatura após suspensão no líquido conservador.

Reação de aglutinação — A não ser o trabalho de Packchanian (1940), que trata do preparo de soros aglutinantes e da pesquisa de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em soros de cobaios infectadas experimentalmente, não só com êstes tripanosoma como com o *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma hippicum*, e o de Senekjie (1943), que investiga a questão da presença

de aglutinininas para os antigenos somatico e flagellar do *Sch. cruzi* nos sôros de coelhos imunisados experimentalmente, nenhum estudo foi feito com relação a esta reação de imunidade na doença de Chagas. Deve-se isto, com tôda a certeza, às dificuldades existentes até a pouco tempo na obtenção de culturas abundantes de *Schizotrypanum cruzi,* sem as quais difícil se torna qualquer trabalho sistemático sôbre o assunto. O próprio Packchanian, nos seus estudos, utilizou da técnica de cultivo no meio de N.N.N.

Outra dificuldade para o estudo desta reação é representada pelo fáto de certas amostras de *Schizotrypanum cruzi,* quando recentemente isoladas, e ainda não perfeitamente adaptadas ao meio artificial de cultivo, apresentarem uma tendência para aglutinção espontânea, quando em presença de um eléctrolito como cloreto de sódio, o que torna de todo impossível o seu emprêgo nas provas de aglutinação.

Marques da Cunha teve ocasião de verificar êste fáto, com grande constância, nas amostras de *Leishmania brasiliensis* recentemente isoladas e que só perdem esta propriedade após serem mantidas por repiques sucessivos, 4 a 6 meses nos meios artificiais de cultura.

Tivemos também ocasião de verificar em relação ao *Schizotrypanum cruzi,* que as culturas de uma mesma amostra obtida em meio líquido apresentam maior tendência a aglutinação espontânea que aquelas feitas num substrato sólido.

Das seis amostras de *Schizotrypanum* que possuímos atualmente, e das quais cinco são recentemente isoladas de casos humanos, três delas (Expedito, Oswaldo Barboza e Raymunda) apresentam uma tendência, embora moderada, para a aglutinação espontânea, enquanto as outras dão suspensões perfeitamente homogêneas em soluto fisiológico. As emulsões mortas, quer por agentes físicos, como químicos (formol, acido fênico, mertiolato, etc.), apresentam uma maior resistência a aglutinação que as suspensões vivas, nescessitando um tempo muito mais longo (24 horas) para a observação do fenomeno quando elas são utilizadas nas provas de aglutinação. As suspensões em soluto fisiológico das culturas vivas para uso nas reações de aglutinação pódem ser guardadas a temperatura de 5° C., durante uma semana e no decorrer dêste prazo, podem ser utilizadas perfeitamente nas reações, sem demonstrar nenhuma variação no seu poder de aglutinar. Após a permanência por 24 a 48 horas nessa temperatura as suspensões de culturas que apresentam uma moderada tendência a aglutinação espontânea mostram-se homogenas, conservando-se assim, mesmo depois de readquirirem a temperatura do laboratório ou serem submetidas a uma temperatura de 37.° C. O exame dessas suspensões revela os parasitos com a mobilidade ligeiramente diminuida. Em nossas pesquisas sôbre aglutinação com soros de

doentes de *Trypanosomiasis americana* e trabalhando com três amostras diferentes de *Schizotrypanum*, nunca observamos variações no poder de se aglutinar dessas amostras, quando em presença de um mesmo sôro, a não ser quando em presença de soros específicos preparados com uma determinada amostra, e assim mesmo as variações observadas foram pequenas. Soros de alto poder aglutinante podem ser obtidos com facilidade em coelhos, bastando para isso três injeções de emulsão morta pelo formol e cinco a seis injeções de uma emulsão viva, rica em parasitas. A via de escolha é a venosa e a intervalo a observar entre as injeções, de 3 a 4 dias, podendo-se obter desta maneira soros aglutinantes com títulos de 1/50.000.

ENSAIOS PRELIMINARES

O nosso primeiro cuidado antes de procedermos ao estudo comparativo a que nos propusemos, entre as duas reações, a de fixação de complemento e ea de aglutinação, na doença de Chagas, foi de verificar por meio de numerosos ensaios qual a técnica a seguir no preparo de um antígeno que apresentasse, além dos atributos imprescindíveis a êsse tipo de reagente (sensibilidade, especificidade e pequeno poder anticomplementar) o de estabilidade, levando em conta o fato de representar a reação, da qual êle é um dos componentes, uma reação de rotina.

Com material abundante obtido de culturas de três amostras de *Schizotrypanum cruzi* (duas recentemente isoladas de casos humanos, amostra Elvira e amostra Raymunda, e uma mantida a longo tempo em cultura, amostra Tatu) preparamos por diferentes processos diversos tipos de antígenos, a saber:

1) Suspensão em soluto hidroglicerinado (segundo técnica de Kelser).
2) Suspensão em soluto fisiológico com mertiolato a 1/10.000 (segundo técnica de Davis).
3) Autolisado em soluto fisiológico, obtido em baixa temperatura.
4) Suspensão em soluto fisiológico com 0,1% de formaldeído.
5) Cultura dessecada no vácuo, à temperatura de 30° C., e reduzida a pó.
6) Extrato alcoólico obtido de cultura (segundo técnica de Romaña e Dias).

Êsses diversos antígenos foram estudados quanto ao seu poder fixador e quanto ao seu poder anticomplementar, em períodos diferentes no decorrer de três meses, sendo mantidos durante êsse tempo numa temperatura de 5.°C.

Para melhor comparação preparamos os antígenos com concentração equivalente de parasitas, usando para isso do processo nefelométrico, com excessão do extrato alcoólico, que foi empregado de acôrdo com a técnica proposta por Romaña e Dias. Os resultados dêsses nossos ensaios se resumem no seguinte:

1) O antígeno formolado é desprovido pràticamente de poder fixador.
2) Autolizados conservam-se mal e ràpidamente o seu poder fixador decai.
3) O antígeno dessecado é dotado de um bom poder fixador e conserva-se bem, quando mantido nesse estado, mas é dotado de um poder anticomplementar maior que o antígeno preparado segundo a técnica de Davis,
4) O extrato alcoólico (técnica de Romaña e Dias) é dotado de um fraco poder fixador em relação aos antígenos preparados segundo as técnicas de Kelser e Davis.
5) O antígeno hidroglicerinado (segundo técnica de Kelser) é dotado de um bom poder fixador, que tende a cair com o tempo, à medida que aumenta o seu poder anticomplementar.
6) A antígeno com mertiolato (técnica de Davis) é dotado de um alto poder fixador e um pequeno poder anticomplementar. Durante três meses êle se manteve estável, sem apresentar modificações.

Êsses ensaios nos levaram à convicção de que o uso do mertiolato na técnica do preparo do antígeno a ser utilizado na reação de fixação de complemento para a *Trypanosomiasis americana*, representa uma notável contribuição e torna possível a estandardização da reação que, a nosso ver, representa o meio mais seguro de que dispomos para o diagnóstico dessa *Tripanosomiasis*.

Queremos aqui assinalar que idênticos resultados obtivemos com seu emprêgo no preparo de antígeno para a reação de fixação de complemento na Leishmaniose tegumentar. Mas já na conservação das suspensões de *Trypanosoma equinum* para emprêgo na reação de fixação de complemento com fim de diagnóstico do *"Mal de cadeiras"*, o antígeno assim preparado mostrou-se muito inferior ao constituído por uma simples suspensão em soluto fisiológico de tripanossomas vivos.

Atividade antigência das amostras de *Schizotrypanum cruzi* e de outras espécies de Trypanosomidae — Cardozo em 1943, trabalhando com sôro de animais experimentalmente infectados, verificou variações acentuadas quanto ao poder fixador das várias amostras de *Schizotrypanum* com que trabalhou,

e aconselhou verificação prévia do poder fixador das amostras com as quais se pretende trabalhar, bem como praticar a reação sòmente quando se dispõe de uma raça capaz de fornecer antígenos com poder fixador reconhecidamente alto.

Nos nossos ensaios com o fim de verificar tal possibilidade, trabalhamos com cinco amostras diferentes de *Schizotrypanum*, sendo quatro isoladas de casos humanos (Expedito, Elvira, Raymunda e Oswaldo Barboza) e uma de tatu (*Dasypus sp.*), amostra esta que vem sendo mantida vários anos em cultivo artificial. Com estas diferentes amostras foram preparados separadamente antígenos segundo a técnica de Davis e depois experimentados na presença de quatro soros de casos de doença de Chagas. Na reação utilizamos a técnica quantitativa e os resultados fornecidos por êsses cinco diferentes antígenos foram pràticamente concordantes. E' possível que as discordâncias verificadas entre os nossos ensaios e os de Cardoso corram por conta da diferença de técnica empregada no preparo do antígeno.

Baseado no fato da maioria das reações de imunidade nos protozoários, darem reações de grupo, um de nós, Muniz, em 1930, demonstrou que antígenos de *T. equiperdum*, preparado de acôrdo com a técnica de Watson, eram capazes de fixar o complemento em presença de soros de doentes da *Tripanosomíasis americana*.

Aproveitando o material abundante que tivemos a nosso dispor, para a feitura do presente trabalho, verificamos que idêntico fáto ocorria em relação ao *T. equinum* e a *L. brasiliensis*. Os resultados que obtivemos trabalhando conjuntamente com antígenos de *T. equinum*, de *S. cruzi* e *L. brasiliensis* são perfeitamente comparáveis. E' verdade que o antígeno específico é capaz de fixar em presença de concentrações menores de sôro, mas nas concentrações mais elevadas (0,2 — 0,1 — 0,05) os resultados foram absolutamente idênticos.

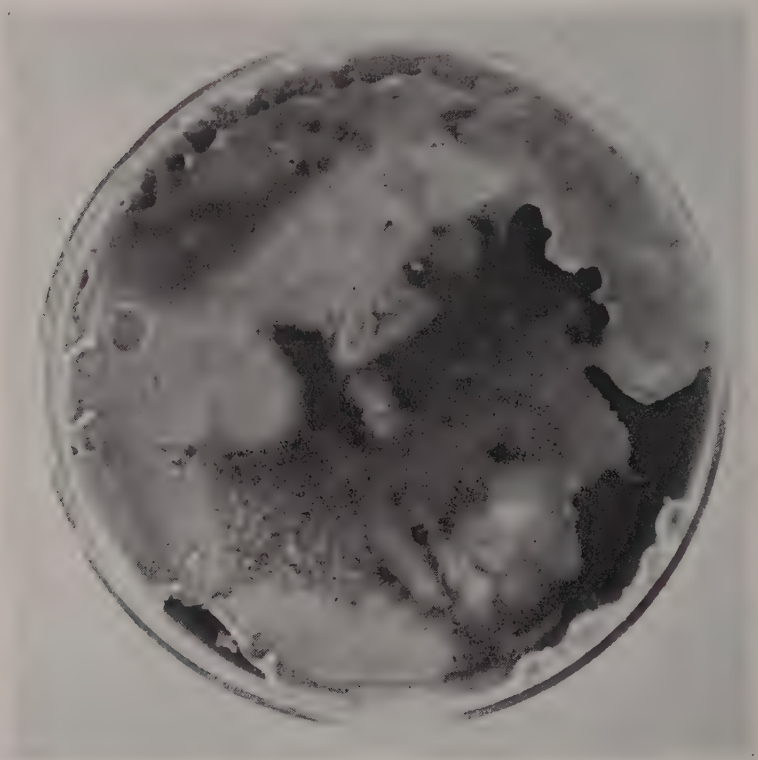
A questão de cultivo e obtenção de massas de *Schizotrypanum cruzi* — Outro ponto de grande importância prática no estudo das diversas reações de imunidade refere-se aos métodos de cultura com o fim de obter abundante quantidade de parasitas não só para o preparo de antígenos como de suspensões para o emprego nessas reações. E' sabido que entre os tripanosomas patogênicos o *Schizotrypanum cruzi* é aquêle de mais fàcil cultivo. Meios como o de N. N. N., Noguchi, agar nutritivo glicosado com sangue de coelho, se prestam admiràvelmente, não só para manutenção das amostras no laboratório como para seu isolamento, quer se parta de sangue humano como de animais infectados. Pela facilidade com que êle se desenvolve nos meios artificiais de cultivo, constitui esta prôva ótimo recurso a ser utilizado com o fim de diagnóstico. Nas culturas a sua vitalidade é bastante longa e em certos

meios como Noguchi, ela pode ser de meses, desde que seja mantida uma temperatura não acima de 30.°. Para obtenção de culturas em massa foram propostas várias fórmulas de meios (Bonacci, Kesler, Senekjie, etc.), que em última análise nada mais são que agar nutritivo glicosado, enriquecido com sangue de coelho.

Pela experiência que temos, somos de opinião que a obtenção de grandes quantidades de parasitos depende mais do modo de se proceder às culturas do que pròpriamente das variações que possam ser introduzidas na composição do meio a ser utilizado. Os elementos básicos são representados pelo sangue e pela glicose. As modificações propostas na confecção do agar nutritivo, representadas pelo emprêgo de componentes dêste ou aquêle fabricante, são de pouca influência, pois até hoje temos utilizado para obtenção das culturas do mesmo agar nutritivo empregado na rotina bacteriológica do nosso Instituto, preparado de acôrdo com a fórmula clássica e com uma peptona de fabricação nacional (Geyer). Quanto aos frascos a serem utilizados, melhores resultados se obtem procedendo as culturas em frascos Erlenmeyer de capacidade de 100 ou 200 cc., do que utilizando garrafas de Roux de maior ou menor capacidade, porque nas mesmas o dessecamento da superfície do meio se processa mais ràpidamente. O modo de se proceder à sementeira é de capital importância. A suspensão das formas evolutivas do *Schizotrypanum* empregada como semente, deve ser bastante rica, dependendo disso e encurtamento do prazo e a riqueza da cultura a ser obtida. A suspensão deve ser feita em caldo nutritivo glicosado, ao qual se adiciona soluto fisiológico na proporção de 1 para 2. A quantidade de semente, representada por essa suspensão, a ser adicionada a cada frasco deve ser suficiente para cobrir completamente a superfície do meio a semear. Costumamos usar para frascos de 100 cc., 1,5 cc; e para os frascos de 200 cc, 2,5 cc. Isto tem por fim manter úmida a superficie do meio e permitir que se forme no fim do 5.° a 6.° dia após a evaporação da camada líquida, um espesso enduto de parasitas sôbre a mesma. Não se tendo êsse cuidado, e empregando-se uma menor quantidade de líquido o desenvolvimento em vez de se processar sob a forma de um verdadeiro manto, ocorre em pontos isolados, sob a forma de colônias, devido ao dessecamento que sofre a superfície do meio, após a evaporação rápida da porção líquida empregada na sementeira.

O emprêgo de abundante camada líquida é desvantajoso, pois fornece cultura muito menos abundante e nela o parasita tem a tendência a se desenvolver formando pequenas colônias constituídas por elementos reunidos sob a forma de roseta, e que dão à cultura um especto grumoso, com tendência a aglutinar espontâneamente, mesmo depois de lavados e suspensos

em soluto fisiológico. A necessidade que tem o parasita, de oxigênio, para o seu cultivo, pode ser demonstrada pela simples observação das culturas em meio de Noguchi, no qual um desenvolvimento abundante ocorre, mas sòmente na camada mais superficial do meio a qual se acha em contato di-



Fotografia de uma cultura de *Schizotrypanum cruzi* (amostra Raimunda) com 8 dias, no meio agar-glicose-sangue de coelho, feita em balão de Erlenmeyer

réto com o oxigênio do ar, enquanto as camadas mais profundas permanecem completamente livres de desenvolvimento.

A experiência nos demonstrou que o cultivo sôbre um substrato sólido permite obter maior rendimento de cultura, evidenciado pelo fato de se conseguir, empregando essa técnica em único cultivo feito em frasco de Erlenmeyer, de capacidade de 200 cc., e contendo apenas 25 cc do meio de cultura, a quantidade de 0,5 cc de uma massa tornada exclusivamente de parasitas.

Outro fator de grande importância é o de se proceder às culturas numa temperatura constante, evitando variações como as que ocorrem quando são deixadas à temperatura ambiente. E' muito comum, quando não se procura evitar êste fator, obter-se resultados muito inconstantes, apesar de se utilizar o mesmo meio de cultivo. A temperatura ótima oscila entre 28.° e 29.° C., embora ocorra desenvolvimento em temperatura um pouco acima (30° a 32°) ou abaixo (24° a 27°) das que acabamos de referir.

A adaptação do parasita ao meio de cultivo se faz ràpidamente, e culturas luxuriantes podem ser obtidas com essa técnica, já na segunda ou terceira passagem após o isolamento. Tôdas as cinco amostras com que trabalhamos, isoladas de casos humanos, se comportaram dessa maneira.

TÉCNICAS USADAS

Meio para cultivo em massa, do *Schizotrypanum cruzi* — A 100 cc. de agar nutritivo glicosado (caldo de carne 100 cc. peptona 1 gr. Cloreto de sódio 0,5 g e glicose 2 g. Esterilização a 120°. pH 7,2 a 7,4) juntar após fusão seguida de resfriamento a 50° graus, 10 cc. de sangue desfibrinado de coelho e 10 cc. de caldo de fígado (25 g. de fígado, 100 cc de água-vapor fluente 20 minutos — filtrar — juntar 1 g de peptona e 0,5 de cloreto de sódio — esterilizar a 120°). Agitar sem formar espuma e por meio de uma pipeta de bola, esterilizada, distribuir em frascos de Erlenmeyer com a capacidade de 100 cc. e prèviamente esterilizados, uma quantidade de meio suficiente para se obter uma camada, com a espessura de 1,5 cm. Após solidificação do agar, os frascos são colocados na estufa a 37° C., de um dia para outro, com o fim de verificar a esterilidade, e, só após esta prova são utilizados para cultura.

Início das culturas e modo de proceder os repiques — A água de condensação de três tubos de meio de N.N.N., semeados dez dias antes com a amostra de *Schizotrypanum* a ser cultivada, é pipetada e misturada num tubo esterilizado com igual volume de caldo glicosado a 2%. Após esta operação, com 1,5 cc de mistura, é feita a sementeira de cada frasco, que depois disso são colocados numa estufa regulada a 28° C. Utilizamos no nosso laboratório, para êsse fim, uma estufa de aquecimento e refrigeração fornecida pela "Precision Scientific Co.". Os balões devem repousar sôbre uma superfície perfeitamente plana, a fim de que o líquido que serviu como semente cubra completamente tôda a superfície do meio. Após 5 a 7 dias, a evaporação da massa líquida, se completa e se acha substituída por um enduto úmido constituído por massas de parasitas.

Utilizando-se como semente esta primeira cultura obtida, torna-se fácil daí por diante, conseguir em série, culturas extremamente ricas em parasitas, bastando para isso, emulsionar o conteúdo de um frasco com uma mistura de caldo glicosado a 2%, duas partes, e soluto fisiológico, 1 parte, e proceder a novos repiques observando as regras acima expostas.

Apesar da sobrevivência das culturas assim obtidas ser longa, a sua utilização para os diversos fins deve ser no máximo, até o 10.º ou 12º dia, devido ao fato que após êsse prazo, começam a aparecer numerosas formas do parasita em desintegração, ocasionada principalmente pelo dessecamento que vem a sofrer o meio.

Técnica para obtenção de cultura em massa de *Leishmania* — Para isso o melhor processo consiste de culturas em placas, utilizando pincéis para sementeira. O meio a ser empregado é o agar nutritivo a 3%, com 2% de glicose, pH 7,2 a 7,4, ao qual se adiciona no momento do preparo das placas, sangue desfibrinado de cavalo na proporção de 1 para 5. Utilizamos nesse trabalho placas de Petri com o diâmetro de 10 cm, e 5 cm de altura. Partindo de culturas em meio de Noguchi, e utilizando sòmente a porção superficial do meio onde ocorre o desenvolvimento do parasita, procede-se à primeira sementeira das placas, utilizando pincéis esterlizados no autoclave e embebidos na semente, e com êle fazendo 3 a 4 estrias sôbre a superfície do meio a semear. Após esta operação as placas são deixadas a temperatura de 22º a 24º, invertidas com a tampa para baixo, e no interior desta são colocados 2 a 3 cc. de uma solução saturada de sublimado em água, com o fim de manter certo grau de úmidade no interior da placa.

Após 8 a 10 dias procede-se a novo repique, partindo do material obtido na primeira cultura, que é recolhido por meio de pincél e com êle feitas novas sementeiras.

Material abundante póde ser obtido após 3 a 4 repiques, e se ter o parasita adaptado a esta forma de desenvolvimento.

Preparo da suspensão de *Schizotrypanum cruzi* **para emprêgo na reação de aglutinação** — Uma cultura de *Schizotrypanum* em frascos de Erlenmeyer, datando de 6 a 8 dias, é emulsionada em solução fisiológica. Para isso se coloca no interior do frasco, no qual se procedeu a cultura, 10 cc de soluto fisiológico, e, por meio de aspirações e jatos sucessivos do líquido sôbre a superfície do meio, obtidos com uma pipeta de Pasteur esterilizada, consegue-se despreender a película formada pelo desenvolvimento do parasita e obter uma suspensão do mesmo. Desde que isso seja conseguido, aspira-se tôda suspensão com uma outra pipeta, na extremidade da qual se enrola uma camada fina de algodão hidrófilo, com o fim de reter tôdas as partículas de gelose que costumam desprender-se do meio durante a primeira ope-

ração. Feito isso, a suspensão é passada para um tubo esterilizado, tendo-se antes o cuidado e por meio de uma pinça flambada retirar o algodão carregado de partícula de gelose que é desprezado.

A emulsão espêssa assim obtida é lavada duas vêzes em soluto fisiológico, usando-se para isso a centrifugação. No final dessa operação a massa de parasitas é novamente suspensa em 5 ou 10 cc. do mesmo soluto, e constitui a suspensão estoque com a qual se procede à feitura da suspensão a ser empregada na reação. A suspensão estoque pode ser guardada em baixa temperatura (5.° C) e servir para o mesmo fim durante usa semana. A maioria dos parasitas nela contida se conservam vivos durante êsse espaço de tempo e se comportam de igual maneira na reação como os da suspensão recentemente preparada.

No momento de ser feita a reação procede-se ao preparo da suspensão a ser empregada, e para isso se coloca num tubo esterilizado um volume suficiente de soluto fisiológico que varia de acôrdo com o número de reações a serem feitas e a êle se adiciona por meio de uma pipeta algumas gotas da suspensão estoque de maneira a se conseguir uma turvação equivalente a que se obtém adicionando 0,05 de uma solução de cloreto de bário a 1%, a 10 cc de um soluto de ácido sulfúrico a 1%.

Suspensões mais concentradas de parasitas não devem ser usadas porque podem mascarar o resultado da reação. E' necessário observar se após o preparo da suspensão ocorre uma aglutinação espontânea do parasita fato êsse que pode ser logo observado e que invalida o emprêgo da mesma na reação.

Técnica da sôro aglutinação — Com os soros separados dos coágulos e libertos das hematias por centrifugação são feitas, utilizando soluto fisiologico, uma série de diluições com títulos diferentes a partir de 1/10 até 1/10240 que são distribuidas na quantidade de 0,5 cc em um número equivalente de tubos de hemolise. Em seguida é adicionado a cada um dêles 0,5 cc da suspensão preparada de acôrdo com a técnica acima descrita. Um tubo testemunha é feito separadamente contendo 0,5 de soluto fisiologico e 0,5 cc de suspensão. Após agitação a série de tubos é colocada em banho-maria a 37° C. A leitura é feita duas horas depois. Os resultados observados são representados da seguinte maneira : ++++ aglutinação total com a formação de grandes flócos (tipo flagelar). +++ aglutinação total com a formação de flocos finos (tipo somatico). ++ aglutinação parcial. O Ausência de aglutinação.

Técnica do preparo do antígeno de *Schizotrypanum cruzi* **para a reação de fixação de complemento** — Nas suas linhas gerais seguimos a técnica proposta por Davis, despresando certos detalhes como centrifugações a baixa

temperatura durante a lavagem das culturas bem como o emprêgo da mistura gêlo seco e metil celossolve com o fim de congelar a suspensão após o seu preparo com a solução salina de mertiolato. Procedemos da seguinte maneira :

Em quatro frascos de Erlenmeyer de capacidade de 100 cc contendo cultura de *Schizotrypanum* com a idade de 6 a 8 dias, são colocadas, em cada um dêles, 5 cc de soluto fisiológico. Pelo mesmo processo já descrito para o preparo da suspensão para o emprêgo na reação aglutinação são obtidos dos quatro frascos suspensões de parasitas livres de partícula de gelose. Em seguida são misturadas e colocadas em tubo centrífugo e submetidas a uma centrifugação violenta (3000 rotações). O líquido que sobrenada é substituído por igual quantidade de soluto fisiológico, tendo-se o cuidado de pôr novamente em suspensão a massa de parasitas obtida no fundo do tubo. Esta operação é repetida por mais duas vêzes com o fim de libertar os parasitas de qualquer traço de substância contido no meio de cultura. Após a última centrifugação o líquido que sobrenada é desprezado e a massa de parasitas suspensa num volume 10 vêzes maior de um soluto fisiológico, contendo mertiolato na proporção de 1/10.000. Utilizando tubos centrífugos graduados esta operação é facilitada. A suspensão espêssa assim obtida é pipetada e colocada num frasco esterilizado e fechado com rôlha de borracha. Após submeter-se o conteúdo do tubo a uma agitação violenta por alguns minutos, êle é colocado na câmara de gêlo de um refrigerador. Diàriamente no período de três dias o tubo é retirado da câmara e submetido após o degêlo à nova agitação, finda a qual é submetido a novo congelamento. Terminadas essas operações, a suspensão estoque de antigeno é mantida no refrigerador a uma temperatura de 5.° C. Dessa maneira a sua conservação se faz pela espaço de vários meses.

Técnica do preparo do antígeno do *Trypanosoma equinum* — Emulsão espêssa de tripanossoma, pode ser obtido para o preparo dêsse antígeno infectando camondongos que são sangrados no coração próximo da morte, quando a concentração de parasitas no sangue é muito elevada (a amostra de *T. equinum* com que trabalhamos mata regularmente o camondongo entre o 4.° e o 5.° dia). O sangue de dois animais é recolhido em 10 cc de soro fisiológico com 1% de citrato de sódio. Essa suspensão é colocada em dois tubos de hemólise e submetida a uma centrifugação de 2500 a 3000 rotações pelo espaço de 1 minuto, findo o qual o líquido sobrenadante dos dois tubos de hemólise é pipetado e recolhido a um tubo de ensaio esterilizado. Nova porção de soluto fisiologico é colocada em ambos os tubos de hemolise que são agitados com o fim de pôr em suspensão os glóbulos juntamente com os tripanossomas que não foram retirados na primeira operação. Ambos os

tubos são sujeitos a uma nova centrifugação com igual velocidade e pelo mesmo espaço de tempo. Novamente o líquido sobrenadante ainda de aspecto turvo é recolhido e misturado ao primeiro. Esta operação se repete três a quatro vêzes e desta maneira consegue-se retirar, pràticamente livre das hematias, a maioria dos tripanossomas existentes no sangue. A suspensão rica em parasitas, recolhida no tubo de ensaio, é submetida por duas vêzes a centrifugação violenta, tendo-se o cuidado de substituir a solução fisiológica, com o fim de eliminar o citrato de sódio que é dotado de poder impediente. A quantidade de soluto fisiológico a ser adicionada no final da operação, deve ser suficiente para que se obtenha uma turvação equivalente ao padrão 3 da escala de Mac Farland. O antígeno assim preparado pode ser empregado no mesmo dia, ou um a dois dias depois, desde que seja conservado em baixa temperatura. E' desprovido pràticamente de qualquer poder anti-complementar.

Técnica de preparo do antígeno de Leishmania — Para o preparo dêsse antígeno, foi utilizada a mesma técnica do preparo do antígeno de *Schizotrypanum cruzi*, isto é, a técnica proposta por Davis.

Técnica da reação de fixação de complemento — Após o preparo do antigeno, êle é submetido a duas provas sendo a primeira para verificação do poder anti-complementar que indicará o título da diluição a ser empregada e a segunda com o fim de verificar o poder fixador quando em presença de um sôro específico obtido de animal ou de doente infectado com o *Schizotrypanum cruzi*. Êsses ensaios devem ser repetidos todos os meses com o fim de verificar qualquer modificação que possa ocorrer em relação a essas propriedades. Em três diferentes amostras de antígeno por nós preparado pela técnica de mertiolato, nunca observamos qualquer poder hemolítico das mesmas. A diluição do antígeno a ser empregada na reação de fixação deve ser igual a duas vêzes o título da menor diluição que não se mostrou dotado de poder anti complementar na dose de 0,2 cc.

O sistema hemolítico utilizado no decorrer dêsses ensaios, como na execução da própria reação, deve conter um excesso de hemolisina equivalente a 5 doses hemolíticas.

No momento de se proceder à prova com os soros suspeitos, o complemento representado por sôro de cobaia na diluição de 1/10 é dosado em presença de igual quantidade da diluição do antígeno a ser empregada nos tubos de reação, isto é, 0,2 cc. A leitura do resultado deve ser feita 1/2 horas após a junção do sistema hemolítico. Conhecida a menor quantidade da diluição do complemento capaz de determinar uma hemólise total e que representa a unidade de complemento, esta é empregada acrescida de 0,1 cc. (unidade retificada) na execução da reação propriamente dita

Determinada a dose de complemento a ser empregada e inativado o sôro pelo aquecimento no banho-maria a 56° C., pelo espaço de 20 minutos, procede-se à execução da reação. Com êsse fim pode-se utilizar duas técnicas, a qualitativa e a quantitativa. Na primeira emprega-se três dose diferentes do sôro em natureza, isto é: 0,2 0,1 e 0,05 cc. Na segunda, que tem por fim a dosagem dos anticorpos fixadores, emprega-se no primeiro tubo da reação 0,2 cc, do sôro em natureza e nos outros igual quantidade de diluições diferentes feitas em soluto fisiológico a partir do título ½.

Nos diferentes tubos de reação, é acrescentado em seguida 0,2 cc do antígeno. Após agitação, os tubos são deixados em repouso pelo espaço de 30 minutos à temperatura do laborátório. Depois disso junta-se a cada mistura uma unidade retificada do complemento (sôro de cobaia a 1/10) e uma quantidade de soluto fisiológico suficiente para se obter um volume de 2 cc. em todos os tubos. Após nova agitação, coloca-se no banho-maria a 37° C., pelo espaço de 1 hora. Além dos tubos de reação devem ser feitos três tubos testemunhas, um contendo 0,2 cc do sôro em natureza e dois outros, contendo 0,4 e 0,2 cc do antígeno. A cada um dêstes tubos é adicionado a unidade retificada do complemento e soluto fisiológico para completar o volume de 2 cc. Como os tubos de reação, são também levados ao banho-maria a 37° C., onde permanecem pelo espaço de 1 hora.

Decorrido o tempo para a fixação, a todos os tubos são adicionados 2 cc do sistema hemolítico.

A leitura final é procedida após ter ocorrido hemólise total nos tubos testemunhas do sôro e do antígeno. Os resultados são expressos por ++++ ausência de hemólise, +++ hemólise ligeira, ++ hemólise parcial, + hemólise quase total e — ausência de hemólise.

MATERIAL DE ESTUDO

Trabalhamos em nossos ensaios com 54 soros assim discriminados:

Soros humanos

Casos agudos de doenças de Chagas	6
Casos crônicos de doença de Chagas	16
Casos suspeitos de doença de Chagas	7
Casos de malária	3
Caso de leishmaniose tegumentar	1
Casos de bouba	3
Casos de lepra	4
Indivíduos normais com Wassermann negativo	10

Sôro de animais

Cão suspeito de infecção com *S. cruzi*	1
Tatu suspeito de infecção com *S. cruzi*	2
Cavalo infectado com *T. equinum*	1

A maioria dos soros de casos agudos, crônicos ou suspeitos de doença de Chagas, provêm de individuos residentes em Bambuy, Estado de Minas Gerais, sendo da mesma proveniência, os soros dos tatus e do cão. Um dos soros dando reação positiva para tripanosomíase, foi obtido de um funcionário do nosso Instituto nascido em Lassance, Estado de Minas Gerais, e a muito tempo residente no Rio de Janeiro. Os soros que serviram de testemunhas, foram obtidos de doentes internados no Hospital Evandro Chagas, no Leprosário de Jacarépaguá e de clinicas privadas.

Devemos à gentileza do nosso colega Dr. Emanuel Dias os dados referentes aos xeno-diagnósticos feitos na maioria dos casos crônicos, bem como os resultados das pesquisas do tripanosoma no sangue dos casos agudos. Para melhor clareza organizamos dois quadros (Quadro I e Quadro II) contendo esses dados e que podem ser observados logo a seguir.

Para caracterização dos diversos soros com que trabalhamos, e para facilitar a nossa exposição quando a êles quisermos nos referir, cada um dêles recebeu um número, que será conservado sempre o mesmo até o final do nosso trabalho.

QUADRO I

CASOS AGUDOS DE DOENÇA DE CHAGAS

Nº. DO SÔRO	NOME	PROVENIÊNCIA	DATA DA VERIFICAÇÃO DO S. CRUZI NO SANGUE
1	Oswaldo Barboza.....	Bambuí	2 de fevereiro 1944
2	Roldão Garcia.....	Bambuí	3 de março 1944
3	Raimunda Maria de Sousa.....	Bambuí	13 de dezembro 1943
4	Expedito Chaves.....	Bambuí	13 de dezembro 1943
5	Nazaré Maria de Jesus.....	Bambuí	28 de março de 1944
6	Nilza Lobato,.....	Bambuí	25 de julho de 1944

QUADRO II

RESULTADO DOS XENODIAGNÓSTICOS NOS CASOS CRÔNICOS E SUSPEITOS DE D. DE CHAGAS

Nº. DO SÔRO	NOME	PROVENIÊNCIA	XENODIAGNÓSTICO POSITIVO EM :	XENODIAGNÓSTICO NEGATIVO EM :	PESQUISA DE TRIP. NO SANGUE
7	José Barbosa	Bambuí			Posit. 1940
8	Rosa Sant'Ana	Bambuí	15–10–40, 9–7–42 e 4–3–43		—
9	Moacyr ds Anjos	Bambuí	20–3–44		—
10	Aparecida Melo	Bambuí	4–8–43		—
11	Hilda Teixeira	Bambuí	9–7–42, 29–1–44		—
12	José Magalhães	Bambuí	3–3–43		—
13	Teresa Maria de Jesus	Bambuí	15–7–44		—
14	Jovina Maria de Jesus	Bambuí			—
15	Luzia Margarida	Bambuí	22–1–44		—
16	Sebastião Rosa	Bambuí	22–1–44		—
17	Maria Madalena de Jesus	Bambuí		22–7–43	—
18	Ana Maria de Jesus	Bambuí	22–1–44		—
19	Maria Umbelina	Bambuí	16–1–41	3–3 e 19–5–43	—
20	Messias José Martins	Bambuí	15–12–43		—
21	Marta de Sousa	Bambuí		31–1–44	—
22	Aparecida de Jesus	Bambuí			—
23	Oto Camilo	Bambuí	21–1–44		—
24	Regina Garcia	Bambuí			—
25	Maria Lobato	Bambuí			
26	Lucilio	Lassance		3 vezes, sem data	—
27	Manuela Fernandes	Bambuí	posit. s/data		—
28	Daniel Martins de Oliveira	Bambuí	7–12–43		—
29	Benevenuto Alves	Bambuí	posit. s/data		—
30	Tatu I	Bambuí		22–8 44	Negativa
31	Tatu II	Bambuí		30–8 44	Negativa
32	Cadela "Bolinha"	Bambuí	18 – 44		

RESULTADOS OBTIDOS

Os resultados que vamos expor foram obtidos parceladamente no decorrer de um período compreendido entre Novembro de 1943, e agôsto de 1944.

Para facilitar o estudo em conjunto, organizamos diversos quadros onde figuram os resultados obtidos das várias questões por nós estudadas no decorrer dêste trabalho. É assim que no quadro IIIestão agrupados todos os ensaios com o fim de verificar os poderes aglutinantes e fixador do complemento das soros de casos agudos, crônicos e suspeitos de Doença de Chagas, para o S. cruzi.

No quadro IV estão agrupados os ensaios com os soros que serviram de testemunha no estudo dessas duas reações.

No quadro V figuram os ensaios feitos com o fim de estudar comparativamente o comportamento de antigenos preparados com *Schizotrypanum cruzi, Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma equinum,* quando na presença de soros de doença de Chagas, de leishmaniose cutânea e do "Mal de cadeira".

O quadro VI compreende os ensaios com o fim de verificar comparativamente o poder aglutinante para *Leishmania brasiliensis* dos soros de doença de Chagas e de um caso de leismaniose cutânea americana.

No quadro VII o resultado dos ensaios feitos com o fim de verificar se o poder aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi* apresentado por soros de individuos normaes corre por conta de anticorpos heterófilos. Na execução dêsses numerosos ensaios foram empregadas rigorosamente as tecnicas expóstas anteriormente.

QUADRO III

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE AGLUTININA E FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM OS SOROS DE CASOS AGUDOS, CRONICOS E SUSPEITOS DE D, CHAGAS

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	AGLUTINAÇÃO PARA O *Schizotrypanum cruzi* (amostra Tatu)									FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO COM ANTÍGENO DAVIES						
			1	1	1	1	1	1	1	1	1	Soro	1	1	1	1	1	1
			40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	Puro	2	10	20	40	80	160
1	Osvaldo Barbosa	caso agudo D. C.	++++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	++++	++++	++++	+++	+++	++	-
2	Roldão Garcia	caso agudo D. C.	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	++	○	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
3	Raymunda Maria de Sousa	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++	○	++++	++++	++++	++	—	—	—
4	Expedito Chaves Campos	caso agudo D. C.	++ +	++++	++++	+++	++++	+++	+++	++	○	++++	++++	++++	+++	++	-	—
5	Nazaré Maria de Jesus	caso agudo D. C.	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	○	○	++++	++++	+++	++	—		—
6	Nilza Lobato	caso agudo D. C.	++	++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—
7	José Barbosa	caso crônico D. C.	++	+++	++++	++++	++++	+++	++	○	○	++++	++++	+++	—	-		
8	Rosa Sant'Ana	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	+++	++	○	○	○	○	++++	++++	++++	++++	++	—	—
9	Moacir dos Anjos	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	+++	++	○	○	○	○	++++	++++	+++	—	—	—	—
10	Aparecida Melo	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	+++	+++	++	○	○	○	++++	++++	++++	+++	+	-	—
11	Hilda Teixeira	caso crônico D. C.	+	+	++	+++	+++	++	○	○	○	++++	++++	++++	++++	+++	++	—
12	José Magalhães	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	++	○	○	○	○	++++	+++	+++	+	—	—	—
13	Teresa Maria de Jesus	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	+++	++	++	○	○	○	++++	++++	++++	+++	+	—	—
14	Jovina Maria de Jesus	caso crônico D. C.	++	++++	+++	++++	++++	+++	+++	○	○	++++	++++	++	—	—	—	—
15	Luzia Margarida	caso crônico D. C.	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	○	○	++++	+++	++	—	—	—	—
16	Sebastião Rosa	caso crônico D. C.	++++	++++	+++	++++	+++	++	○	○	○	++++	++++	+++	—	—	—	—
17	Maria Madalena de Jesus	caso suspeito D. C.	+++	++++	++++	+++	+++	++	○	○	○	++++	++++	++	—	—	—	—
18	Ana Maria de Jesus	caso crônico D. C.	+++	+++	+++	++	○	○	○	○	○	++++	+++	+	-	-	-	—
19	Maria Umbelina	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	○	○	++++	++++	-	—	—	—	—
20	Messias José Martins	caso crônico D. C.	++	++	+++	+++	+++	++	○	○	○	++++	+++	-			-	—
21	Marta de Sousa	residente em Bambuí caso suspeito	++++	++++	+++	++	○	○	○	○	○	++++	++++	-	—	—	-	—
22	Aparecida de Jesus	caso suspeito D. C.	+++	++	+	○	○	○	○	○	○	++++	++++	++	—	—	—	—
23	Oto Camilo	caso crônico D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	++++	++++	++				—
24	Regina Garcia	residente em Bambuí caso suspeito D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
25	Maria Lobato (mãe de Nilza Lobato)	residente em Bambuí caso suspeito D. C.	○	○	○	○	○	○	○	○	○	-	—	—			-	—
26	Lucílio	nascido em Lassance	++++	++++	+++	+++	+++	+++	++	○	○	++++	++++	+++	++	—	—	—
27	Manuela Fernandes	caso crônico D. C.	++	++	++	+++	+++	++	○	○	○	++++	++++	++++	++	—	—	—
28	Daniel Martins de Oliveira	caso crônico D. C.										—	—	-			-	—
29	Benevenuto Alves	caso suspeito D. C.	++++	++++	++++	+++	++	++	○	○	○	++++	++++	++++	+++	++	—	—
30	Tatu I	proveniente de Bambuí	++++	++++	+++	+++	+++	++	○	○	○	++++	++++	++++	+++	++	—	—
31	Tatu II	proveniente de Bambuí	++++	++++	+++	+	○	○	○	○	○	++++	++++	++	+	—	—	—
32	Cadela Bolinha	Bambuí	++++	++++	++++	+++	++	○	○	○	○	++++	++++	+++	—	—	—	—

QUADRO IV

RESULTADOS DAS REAÇÕES DE AGLUTININA E FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO COM OS SOROS QUE SERVIRAM DE TESTEMUNHO

N.º DO DOSO	NOMES	CASO CLÍNICO	AGLUTINAÇÃO PARA O *Schizotrypanum cruzi* (amostra Tatu)									FIXAÇÃO DE COMPLEMENTO COM ANTÍGENO DE *S. cruzi* (método de Davis)						
			1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240	Soro puro	1/2	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160
33	Jorge Vírgino	Malaria	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—		—		—
34	Jovino Correia	Leishmaniose tegumentar	○	○	○	○	○	○	○	○	○	+++	++	—	—	—	—	—
35	Sérgio Salvador	Wassermann negativo	++															
36	Manuel Nunes	Wassermann negativo	+++	++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
37	José Silva	Wassermann negativo	++	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—			—	
38	Antônio Nunes	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
39	Osvaldo Silva	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
40	Jerônimo Martins	Wassermann negativo	+++	++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
41	José Barroso	Malaria	○	○	○	○	○	○	○	○	○			—	—		—	
42	Adrelina	Malaria terçã maligna	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—		—	
43	S. T.	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
44	M. K.	Wassermann negativo	+-	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
45	S. M.	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
46	Manuel B. Anchieta	Bouba Rio Bonito W. positivo	+++-	+++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
47	Francisco Mendonça	Bouba Rio Bonito W. posltivo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
48	Jorge Ferreira	Bouba Rio Bonito W. positivo	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	
49	L. Teixeira	Lepra	++	++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
50	G. Vieira	Lepra	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
51	A. Mendes	Lepra	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—
52	J. dos Santos	Lepra	++	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—			—
53	José Chinês	Wessermann negativo	+++	+++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	-	—	—
54	Cavalo	Infectado experimentalmente com Trypanosoma equinum	++++	+++	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—	—	—	—

QUADRO V

ESTUDO COMPARATIVO DO PODER FIXADOR DOS ANTÍGENOS DE *S. cruzi*, *T. equinum* e *Leishmania brasiliensis* EM PRESENÇA DE DIVERSOS SOROS

N.º DO SORO	NOME	CASO CLÍNICO	ANTÍGENO *Schizotrypanum cruzi* (mét. de Davis)					ANTÍGENO *Leishmania brasiliensis* (Mét. de Davis)					ANTÍGENO *Trypanosoma equinum* (Vivo)				
			PURO	1/2	1/10	1/20	1/40	PURO	1/2	1/10	1/20	1/40	PURO	1/2	1/10	1/20	1/40
1	Hilda Teixeira	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	++++	++++	+	—	—	++++	++++	+	—	—
2	Roldão Garcia	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	+++	++	++++	++++	++	—	—	++++	+++	—	—	—
12	José Magalhães	caso crônico D. C.	++++	+++	++	+	—	++	—	—	—	—	++++	++	—	—	—
13	Teresa Maria de Jesus	caso crônico D. C.	++++	++++	++++	+++	+	++++	+++	—	—	—	++++	++++	++	-	—
28	Daniel Martins de Oliveira	caso crônico D. C.	—	-	-	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
29	Benevenuto Alves	caso suspeito D. C.	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	++	—	—	++++	+++	++	—	—
30	Tatu I	suspeito de infecção pelo Schizotrypanum cruzi	++++	++++	++++	+++	++	++++	+++	++	—	—	++++	++++	++	+	—
31	Tatu II	suspeito de infecção pelo Schizotrypanum cruzi	++++	++++	++	+	—	++++	++++	+	—	—	++++	++++	+	—	—
24	Jovino Correia	Leishmaniose tegumentar	+++	++	—	—	—	++++	+++	++	—	—	+++	++	—	—	—
54	Cavalo	Infectado experimentalmente com trypanosoma equinum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	++++	++	++	—

QUADRO VI

ESTUDO COMPARATIVO DO PODER AGLUTINANTE DE DIVERSOS SOROS PARA A *Leishmania brasiliensis*

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	SORO DE AGLUTINAÇÃO PARA *Leishmania brasiliensis* (AMOSTRA 14)								
			1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120
1	Oswaldo Barbosa	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++
3	Raimunda Maria de Souza	caso agudo D. C.	++++	++++	++++	++++	+++	++++	+++	++	○
41	José Barroso	malária	++++	+++	+++	○	○	○	○	○	○
43	S. T.	Wassermann negativo	++++	+++	+++	○	○	○	○	○	○
44	S. M.	Wassermann nagativo	+++	++	○	○	○	○	○	○	○
34	Jovino Correia	Leishmaniose tegumentar	lisou	++++	+++	++	○	○	○	○	○

QUADRO VII

DEMONSTRAÇÃO DA PRESENÇA DE ANTICORPOS HETEROFILOS NOS SOROS NORMAIS AGLUTINANDO O *Schizotrypanum cruzi*

N.º DO SORO	NOMES	CASO CLÍNICO	AGLUTINAÇÃO COM *S. cruzi* (AMÓSTRA TATÚ)								
			1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	1/1280	1/2560	1/5120	1/10240
6	Nilza Lobato	caso agudo D. C.	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
46	Manuel Anchieta	Bouba	+++	+++	+	○	○	○	○	○	○
53	José Chinez	Wassermann negativo	++	++	○	○	○	○	○	○	○
	APÓS ABSORÇÃO COM POLPA DE RIM DE COBAIA										
6	Nilza Lobato	caso agudo D. C.	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	++
46	Manuel Anchieta	Bouba	○	○	○	○	○	○	○	○	○
53	José Chinez	Wassermann negativo	○	○	○	○	○	○	○	○	○

ANÁLISE DOS RESULTADOS

Comparando os resultados obtidos com o xenodiagnóstico e com a fixação de complemento verificamos que a maioria dos soros de doentes com xeno positivos deram reações positivas de fixação com excepção do sôro 28 que apresenta um xeno positivo e a reação de fixação negativa.

Resultado inverso verificamos em relação aos soros 17, 21 e 26, cujos xenos foram negativos e no entanto a reação de fixação foi positiva. O sôro 19 que apresenta um xeno positivo em 1941 e dois xenos negativos no ano de 1943, deu uma reação de fixação positiva.

O estudo comparativo entre as reações de aglutinação e de fixação mostra uma grande concordância de resultados, não só nos casos agudos como nos casos crônicos. Uma única exceção foi verificada em relação ao sôro n.º 23, caso crônico cuja reação de aglutinação foi negativa enquanto a de fixação foi positiva. Parece não haver uma relação muito estreita na intensidade das duas reações, pois soros que aglutinaram num título elevado fixaram o complemento quando em concentrações mais altas, enquanto outros dotados de menor poder aglutinante fixaram em menores concentrações. Todos os soros dos casos agudos mostraram-se dotados de alto poder aglutinante, sendo que em dois deles (1 e 6), êsse pder atingiu o título de 1/10.000. Nos casos crônicos o poder aglutinante mostrou-se variável, sendo de notar contudo que em muitos dêles, mostrou-se elevado, chegando mesmo ao título de 1/2560. O teor mais baixo em aglutinina foi verificada no sôro 22 que aglutinou fracamente no título de 1/160. O fato observado com alguns soros de aglutinações mais intensas ocorrem nos tubos com diluições mais elevadas pode ser explicado pela presença de maior concentração de proaglutinóides nas menores diluições do sôro. Em relação aos tipos de aglutinação, observa-se, em regra, o flagear (H) ocorrendo nas concentrações maiores de sôro e somático (O) nas diluições mais elevadas embora alguns soros apresentou sòmente aglutinação do typo somatico.

Passando ao estudo do comportamento dos soros que serviram de testemunha em relação a essas duas reações verifica-se que o único sôro que deu reação positiva de fixação foi o 34, de um caso de leishmaniose tegumentar, embora se mostrando desprovido de poder aglutinante. Dos 22 soros utilizados, cinco aglutinaram no título de 1/80 e cinco outros sòmente no título de 1/40.

Ensaios realizados com os soros 46 e 53 de proveniencia humana que se mostraram capazes de aglutinar no título de 1/80 mais fortemente o *Schizotrypanum cruzi* demonstraram possuirem êles poder aglutinante nos títulos de 1/160 e 1/320 para glóbulos de carneiro e serem dotados de poder hemo-

lítico para os mesmos. Submetidos a prova de absorção com polpa de rim de cobaio (Quadro VII) se mostraram incapazes de aglutinar novamente o *Schizotrypanum cruzi*, demonstrando êsse fato correr por conta de anticorpos heterófilos o poder de que são dotados.

Os resultados por nós obtidos no estudo comparativo do poder fixador de antígenos preparados com *Schizotrypanum cruzi*, *Leishmania brasiliensis* e *Trypanosoma equinum* (Quadro V) quando em presença de soros de doença de Chagas, leishmaniose tegumentar e de equídeo infectado com *Trypanosoma equinum*, constituem mais um exemplo para se considerar a reação de fixação de complemento uma reação de grupo. A concordância dos resultados obtidos com êsses diferentes antígenos, foi bem acentuada, em relação aos soros de doença de Chagas e leishmaniose, principalmente nos tubos contendo maior concentração de soro. Resultado diferente foi observado em relação ao sôro do equídeo infectado com o *Trypanosoma equinum* que só fixou em presença do antigeno específico.

Fomos levados em vista do resultado negativo com o sôro n.º 34 de leishmaniose tegumentar na prova de aglutinação para o *Schizotrypanum cruzi* a verificar se igual comportamento ocorria com os soros de doença de Chagas quando em presença de *Leishmania brasiliensis*. Os resultados acham-se expostos no quadro VI. Por êle podemos ver que os dois soros (Sôro 1 e 3) de casos agudos dessa doença usados nesse ensaio aglutinaram num título mais elevado (títulos de 1/2560 e 1/5120) a amostra de *Leishmania brasiliensis* que o sôro (34) do caso de lesihmaniose tegumentar que só aglutinou no título de 1/160. O tipo de aglutinação dominante observado nos tubos contendo os soros dos casos agudos de Doença de Chagas foi o H.

O comportamento apresentado pela amostra de *Leishmania brasiliensis* em relação aos três soros testemunhas (41, 43 e 44) falam a favor da presença na constituição antigênica da *Leishmania brasiliensis* de antígenos heterófilos, talvez em maior concentração que no *Schizotrypanum cruzi*.

Os resultados obtidos nos diferentes ensaios acima expostos falam a favor de uma maior concentração de antígenos de grupo na constituição do *Schizotrypanum cruzi* que nas do *Trypanosoma equinum* e da *Leishmania brasiliensis*.

RESUMO E CONCLUSÕES

Trabalhando com 24 soros provenientes de casos agudos e crônicos cujos diagnósticos foram estabelecidos quer pela pesquisa direta do parasita (casos agudos) quer pelo xenodiagnóstico ou fixação de complemento (casos crônicos) podemos demonstrar em 26 destes soros a presença de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em títulos que variaram de 1/160 a 1/10240.

Os casos agudos apresentaram um mais alto teor variando os títulos entre 1/2560 e 1/10240 e os casos crônicos entre 1/2560 e 1/160. Um único sôro apresentou resultado negativo.

Em 10 dos 22 soros que serviram de testemunha e entre os quais figuravam um de leishmaniose tegumentar e outro de um cavalo infetado experimentalmente com *Trypanosoma equinum,* puderam ser demonstrados a presença de aglutininas para o *Schizotrypanum cruzi* em títulos que não ultrapassaram de 1/80.

Em dois dêsses soros que maior concentração de aglutininas apresentavam e que provinham um de caso de bouba com Wassermann positivo e outro de um indivíduo considerado normal, com Wassermann negativo, as pesquisas demonstraram possuirem ambos, hemolisinas e aglutininas para glóbulos de carneiro em títulos que variavam entre 1/160 e 1/320. Êsses soros submetidos à prova de absorção com polpa de rim de cobaia perderam completamente o poder aglutinante para o *Schizotrypanum cruzi,* fato que não ocorreu com o sôro de doença de Chagas servindo de testemunha que só ligeira modificação apresentou quanto ao primitivo título aglutinante. Ficou evidenciado dessa maneira correr por conta de um anticorpo heterófilo o poder aglutinante que são dotados certos soros de indivíduos livres de infecção pelo *Schizotrypanum cruzi* e a presença de um componente heterogenético na estrutura antigenica desse parasita. No decurso dêste trabalho pudemos verificar que idêntico fáto ocorre em relação a *Leishmania brasiliensis.* Essa verificação é de valor prático porque se pode com facilidade eliminar as reações inespecíficas.

Ao contrário do que observamos possuírem soros de casos agudos da doença de Chagas, elevado poder aglutinante para *Leishmania brasiliensis* (1/2560 e 1/5120) o sôro leihmaniose tegumentar foi incapaz de aglutinar o *Schizotrypanum cruzi,* sendo o agente específico aglutinado por êle no título de 1/160.

Os fatos que acabamos de expor, em relação à prova de aglutinação na *Tripanosomíasis americana* demonstram claramente o seu valor, podendo constituir, quando positiva um meio seguro no diagnóstico dessa doença. Eliminada a hipótese de aglutinações inespecíficas por meio da absorção com polpa de rim de cobaia, o título de 1/160 fala a favor de uma infecção pelo *Schizotrypanum cruzi.* A maioria dos sôros de doença de Chagas por nós estudados apresentaram os dois tipos de aglutinação H e O, ocorrendo o primeiro nas maiores concentrações de sôro e o segundo nas menores. Alguns soros, contudo, apresentaram aglutinação sòmente do tipo somático.

O estudo do comparativo que fizemos dos diversos antígenos propostos para a fixação de complemento na doença de Chagas e os resultados por nós

obtidos no decorrer das nossas pesquisas utilizando o antígeno de Davis, autoriza-nos afirmar que o emprêgo do mertiolato permitindo obter um antígeno de alto poder fixador e estavel por um longo período, resolveu o maior empecilho que se antepunha à necessária standartização dessa reação para o emprêgo como técnica de rotina.

No preparo do antígeno de *Leishmania,* o mertiolato se mostrou também superior a qualquer outro conservador, proporcionando um antígeno estável dotado de bom poder fixador e funcionando como um ótimo alergeno na prova de intra-dermo reação. Em relação ao preparo de antígeno com o *Trypanosoma equinum,* a conclusão que chegamos após numerosos ensaios é de que a simples suspensão de trypanosomas em soluto fisiológico apresenta um maior poder fixador que aquelas feitas em mertiolato ou em mistura hidroglicerinada, sendo desprovidas de todo poder anticomplementar, possuindo, porém, desvantagem de só poder ser utilizada no curto prazo de 2 a 3 dias quando mantidos a temperatura de 5.º graus.

Na série de reações de fixação a que procedemos em 27 soros de doença de Chagas utilizando o antígeno de *Schizotrypanum cruzi* com mertiolato, obtivemos um único resultado negativo e tratava-se de um caso que possuía um xenodiagnóstico positivo datando de pouco tempo. Com êsse sôro não pudemos realizar a prova de aglutinação devido a quantidade enviada ter sido pequena. Foi o único caso discordante. A reação de fixação mostrou-se dotada de grande especificidade, menos em relação ao sôro do caso de leishmaniose tegumentar que fixou até a diluição de 1/2. Já o sôro de cavalo com infecção pelo *Trypanosoma equinum* deu um resultado negativo, o mesmo acontecendo com todos os outros que serviram de testemunhas.

Em relação a concentração de anticorpos fixadores nos soros de doença de Chagas, pudemos observar que alguns dêles foram capazes de fixar mesmo no título de 1/80, mas a maioria não ultrapassou os títulos de 1/10 e 1/20. De um modo geral os soros dos casos agudos demonstraram possuir uma maior concentração de anticorpos fixadores que os casos crônicos.

Os soros de doentes portadores da doença de Chagas na presença dos antígenos de *Leishmania brasiliensis* e de *Tryponosoma equinum* mostraram-se capazes de fixar o complemento e os resultados observados nos tubos contendo maiores concentrações de sôro, foram iguais aos obtidos quando em presença do antígeno específico.

O sôro de leishmaniose tegumentar comportou-se de igual maneira embora com menor intensidade, mas o sôro de equídeo infectado com *Trypanosoma equinum* só fixou em presença do antígeno homólogo.

Êsses resultados com os obtidos nas provas de aglutinação além de confirmarem um fato já conhecido das reações de imunidade darem reações

de grupo, servem para demonstrar que na constituição antigênica do *Schizotrypanum cruzi* entram em maior concentração antígenos com essas características do que nas do *Trypanosoma equinum* e da *Leishmania brasiliensis*.

O estudo comparativo dos resultados obtidos com as reações de aglutinação e de fixação de complemento em soros de doentes de *Tripanosomiasis americana* demonstra concordância entre as duas reações. Em 24 soros só um apresentou reação de fixação positiva com a ausência de aglutininas. Êsse sôro provinha de um caso crônico com xenodiagnóstico positivo.

Em vista do número relativamente pequeno de soros com que trabalhamos, só um estudo sistemático das duas reações em soros dos indivíduos residentes em regiões nas quais grassa essa endemia poderá determinar o grau de concordância dessas duas reações.

Quanto a intensidade das duas reações, em relação a um mesmo sôro, foi observado variações, pois soros que aglutinavam num título elevado, só fixaram o complemento quando em concentrações mais altas, enquanto outros dotados de menor poder aglutinante foram capazes de fixar em concentrações mais baixas.

Dos processos mais comumente utilizados até hoje para a diagnose dos casos crônicos de *Trypanosomiasis americana*, a fixação de complemento se nos afigura ser aquêle que resultados mais sólidos e seguros oferece, pois o xenodiagnóstico além de exigir um espaço de tempo relativamente longo para obtenção dos resultados (40 a 50 dias), falha em muitos casos.

A técnica de Davis resolveu o maior empecilho que se antepunha ao emprego dessa reação, permitindo a obtenção de um bom antígeno que se mantem estável por espaço de tempo bastante longo.

A obtenção de culturas em massa de *Schizotrypanum* para o seu preparo é de técnica fácil, não necessitando de meios de cultivo com composição complexa. Os elementos básicos, são representados por sangue de coelho e a glicose. O modo de se proceder as sementeiras bem como o emprêgo de uma temperatura constante (28 a 29.° C.), são de capital importância. O desenvolvimento sob um substrato sólido humedecido dão um rendimento muito maior que culturas em camada líquida abundante.

Antes de terminar queremos agradecer ao Dr. Emmanuel Dias as facilidades que nos proporcionou na obtenção da maioria dos soros com que trabalhamos, bem como pelos dados referentes aos xenodiagnósticos e exames direto do sangue. Ao nosso mestre Dr. Aristides Marques da Cunha e ao Dr. Genard Nobrega pelas facilidades na obtensão dos soros dos casos hospitalizados no Hospital Evandro Chagas e ao nosso técnico Sr. Atílio Borrielo pelo auxílio prestado no decorrer dêste trabalho.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

1) The AA. present a contribution toward the elaboration of a method for the laboratory diagnosis of Chagas' disease, suitable for routine work.

2) Complement fixation test has been studied in detail and attempts to remove the difficulties which prevent the practical application of this test, have been realized.

3) Agglutination test has been performed on acute and chronic cases of Chagas disease as well as in healthy individuals, and results compared with complement-fixation test.

4) The organisms used as antigen in both tests have been cultured successfully in a broth-dextrose-rabbitt blood-agar in Erlenmeyer flasks, covered by a thin layer of liver broth-glucose, as described in the text. In this medium the flagellates have grown luxuriantly and a single Erlenmeyer flask containing only 25 cc. produces more or less 0,5 cc. of packed flagellates.

5) A comparative study of the various antigens (Romaña & Dias, Kelser, Davis etc.) proposed for the complement fixation test led to the following conclusions.

a) A suspension of the parasites killed and preserved with 0,1% formalin, is practically devoid of fixation power.

b) Autolysates present poor preservation capacity and its fixative activity rapidly falls.

c) Dessicated flagellate bodies are easily preserved and fix very well the complement, but is more strongly anti-complementary than Davies antigen.

d) Romaña & Dias antigen presents a weak fixative power as compared with Kelser and Davis preparations.

e) Kelser antigen when recently prepared, has a highly fixative capacity which soon falls, with a progressive increase in its anticomplementary activity.

f) Davis antigen is the best. It has a strong fixative power, and a small anticomplementary activity which are not altered by storage, at least for three months, in accordance with AA. experience. This antigen has been adopted in this work.

6. Variations in the fixative capacity of different strains of *Schizotrypanum cruzi* could not be observed.

7) The complement fixation applied to sera from cases of Chagas' disease but using an antigen suspension of *Leishmania brasiliensis* (Davis method) and *Trypanosoma equinum* (living organisms) has shown a strong fixative property of both antigens, chiefly in tubes with a greater concentration of the serum.

A different result was observed in relation to the behaviour of horse serum which gave positive fixation reaction only in the presence specific antigen (*Trypanosoma equinum*).

These observations as well as the action of Chagas disease sera on *Leishmania brasiliensis* and vice-versa (see tables V and VI), suggests the existence of greater concentration of group antigens in the *Schizotrypanum* cruzi than in *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma equinum.*

8) Davis method has been tried with *Leishmania brasiliensis* and *Trypanosoma equinum.* With the former, it gaves entirely satisfactory results in the complement fixation test and allergic skin test for diagnosis of cutaneous leishmaniasis, With *Trypanosoma equinum* as antigen in the complement fixation test in presence of sera from horses with "mal de cadeiras" this method has offered results incomparably poorer than living suspension.

9) This test has been performed with sera from 24 cases of Chagas' disease controled by xenodiagnosis or by the evidentiation of parasites in the blood. All samples have fixed the complement, except one, the serum nr. 28 (see table III which did not fix the complement, in spite of presenting positive xenodiagnosis. Sera nrs. 17, 21 and 26 gave positive complement fixation reaction with negative xenodiagnosis.

Two sera from suspected "armadillos" gave positive reactions as well as a suspected dog.

Three cases of malaria reacted negatively as well as four cases of leprosy, one presenting Wassermann positive, nine normal sera with that reaction negative. Sera from three cases of yaws with positive Wassermann reaction, exhibited also negative results.

Finally a serum from a horse infected with *Trypanosoma equinum,* gave equally a negative result.

The only exception amongst the controls was a case of skin leishmaniasis which fixed the complement with the lowest dilution of the serum (1/2).

10) The AA. introduced the agglutination test as a diagnosis method for human cases of Chagas' disease.

The technic has been described in detail at the first part of this work. Twenty six sera from the cases of acute and chronic Chagas' disease, which have been used for complement fixation, were used for agglutination test,

as well as the sera from the three suspected animals, and from the cases of other diseases used for the complement fixation test.

11) Positive results were obtained in 25 of the 26 cases, and agglutination was observed at dilutions varying between 1/160 to 1/10240. Only one case of Chagas' disease did not gave positive test.

12) Acute cases furnished more potent agglutinating sera, acting in higher dilution (1/2560 to 1/10240). The samples from chrónic cases have shown agglutinating activity in dilutions from 1/160 to 1/2560.

13) The sera from the two suspected "armadillos" and one dog agglumann positive serum, gave negative results.

14) The 3 cases of malaria, 1 case of skin leishmaniasis and 1 Wassermann pos. serum, gave negative results.

15) Some samples from healthy individuals as well as cases of leprosy, yaws and the horse infected with *Trypanosoma equinum,* have shown agglutinating activity in lower dilutions, not higher than 1/80. This unexpected behaviour as has been demonstrated in two human sera, possessing the highest activity observed, is due to the presence of heterophilic anti-bodies, as shown by the fact that the same samples have agglutinate sheep corpuscles in higher dilution (1/160 to 1/320), and this activity has been lost by absorption through guinea pig kidney pulp. Sera from cases of Chagas' disease absorved by the same material, have mantained practically their agglutinating capacity, with only a slight alteration, as summarized in table VII.

16) Acute cases of Chagas' diseases possess high agglutinating activity upon *Leishmania brasiliensis* used as antigen, manifested in dilutions from 1/2560 to 1/5120, but the serum from cutaneous leishmaniasis failed to agglutine *Schizotrypanum cruzi*.

The serum tested has activity against the homologous antigens at 1/160.

17) The majority of the samples of sera tested for agglutinins has shown types of H and O agglutination, ocurring the former at higher concentrations and thesecond at the lower ones. With some sera almost exclusively somatic agglutination was observed.

18) The results of both agglutination and complement fixation tests, are shown in table III.

The accordance in the results between the two tests is perfectly satisfactory. Only one sample which has fixed the complement demonstrated the absence of agglutinins. This was a case of chronic Chagas' disease with positive xenodiagnosis.

19) Concerning the intensity of both reactions on a same serum, not a such accordance has been observed because some samples, which revealed a strong agglutinating capacity, have fixed the complement only in higher concentrations.

20) Agglutination reaction, when positive at dilution higher than 1/160 and with control of heterophilic antibodies with the sera agglutinating at low dilutions (1/80, 1/160), seems to be a very useful diagnostic method for Chagas disease.

21) Until further data on these reactions will be available, complement fixation test is the most secure method for the diagnosis of this disease, and the AA. believe that with the introduction of Davis antigen and of methods for mass culture of the flagellates in accordance with the technic herein given, this test is perfectly apt to be included amongst routine methods for laboratory diagnosis of Chagas disease.

BIBLIOGRAFIA

Cardoso, F. A.
1943. Bol. n.º 79 Inst. Hig. São Paulo.

Cunha, A. M. da & Dias, E.
1939. C. R. Soc. Biol., 129 : 991.

Cunha, A. M. da & Vilela, E.
1919. Citados por Vilela e Bicalho.

Davis, D. J.
1943. Publ. Health Rep. 58 : 20

Guerreiro, C. & Machado, A.
1913. Brasil Med. n.º 23 : 225.

Kelser, R. A.
1936. Am. J. Trop. Med. 16 : 405.

Lacorte, J. G.
1927. Mem Inst. O. Cruz 20 : 197.

Minning, W.
1935. Arch. f. Schiffs-u. Tropenhyg. 39 : 315.

Muniz, J.
1930. V Reunion Soc. Arg. Pat. Reg. n.º 2 : 297.

Packchanian, A.
1940. Publ. Health Rep. 55 : 46.

Patto, O.
1930. An. Fac. Med. Minas Gerais.

Romeiro, O. S.
1941. O Hosp. 20 (4) : 587-590.

Senekjie, H. A.
1943. Am. J. Trop. Med. 23 : 5.

Senekjie, H. A.
1943. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 52 : 1.

Villela, E.
1930. An. Fac. Med. Minas Gerais 2 (1):1-18.

Villela, E. & Bicalho, C.
1923. Mem. Inst. Os. Cruz 26 : 13-29.

Sobre uma nova especie de Crustacea Stomatopoda: Squillerichtus Aragaoi (*)

por

Lejeune P. H. de Oliveira

(Com 1 estampa e 7 figuras)

Dedicamos esta nova espécie do gênero larvário *Squillerichtus* ao Professor Dr. Henrique de Aragão, homenageando modestamente ao orientador dos estudo hidrobiológicos e ao esforçado pioneiro que está a instalar pela primeira vez uma Estação de Hidrobiologia no Brasil.

Diagnose — pelo caracteres do telson.

Descrição — Carapaça grande, lamelosa, de forma de tronco de cone, estreitada na parte anterior, e, se alargando para a parte posterior (fig. 2), translúcida quase transparente, lisa e sem sulcos, armada de: 1.º) um rostro espiniforme, que vem de pouco antes do somito oftálmico, reto e dirigido para a frente; 2.º) dois prolongamentos espiniformes pequenos nascendo nos ângulos ântero-laterais direito e esquerdo; 3.º) dois grandes prolongamentos espiniformes nos ângulos póstero-laterais. Pela face dorsal a carapaça recobre todo o cefalotórax e o 1.º e o 2.º somitos abdominais; pela face ventral: (fig. 1) as margens nascem pouco depois dos prolongamentos espiniformes ântero-laterais e vêm como uma linha pouco ondeada.

Antênulas (fig. 3) inseridas abaixo e atrás dos pedúnculos oculares. O pedúnculo antenular se compõe de três artículos, e leva internamente, na extremidade, um flagelo multiarticulado, e externamente: de um pedúnculo comum nasce um palpo e um flagelo multiarticulado.

As antenas (fig. 4) são inseridas a pouca distância das precedentes, tem o protopódito grosso, formado de dois artículos, sendo que o 1.º da nascimento pelo bordo anterior de sua extremidade distal a uma haste curta composta de dois artículos pedunculares e de um filete multiarticulado (endopódito) e o 2.º leva na sua extremidade uma grande lamina oval (o exo-

(*) Recebido para publicação a 30 de agôsto e dado à publicidade em outubro de 1944.

pódito antenal) com cerdas mais aproximadas na parte distal que nas margens.

Patas raptoriais (fig. 5) com os dátilos e propodos lisos. Patas torácicas dos três pares seguintes (fig. 7) escondem a bôca, cada uma delas termina por uma mão quelífera ovalar formada por um artículo em forma de disco no qual se insere o dátilo.

Nos três últimos somitos torácicos vê-se bem nitidamente as suturas. Em somito se insere um par de patas biramosas, delgadas, sem epipóditos, de protopódito composto de três segmentos dos quais o 2.º é o maior, o ramo anterior é biarticulado e o ramo posterior compreende um só artículo. Os três pares são todos dirigidos para trás, o 1.º é o menor e o 3.º é o maior.

Abdome: vista dorsal (fig. 2) os somitos que se vê (do 3.º em diante) apresentam uma depressão mediana em baixo relêvo, e duas depressões maiores de um e de outro lado das depressões medianas. Pela face ventral (fig. 1): 5 pleópodos, cada um com o protopódito retangular no qual se inserem o endopódito e o exopódito, lamelares e menbranosos. Exopódito dos urópodos com dois dentes na margem externa.

Telson: (fig. 6) Metade do lado direito: 3 espinulas submedianas, 1 espínula submediana, 10 espínulas intermediárias, 1 espinha intermediária, 2 espinhas laterais, 1 dente lateral, e, para fóra do dente lateral: 2 espinhas marginais. Ou, resumidamente: 2 espinhas marginais, dente lateral e 17 espinhas até ao meio.

Metade do lado esquerdo: simétrica com o lado direito.

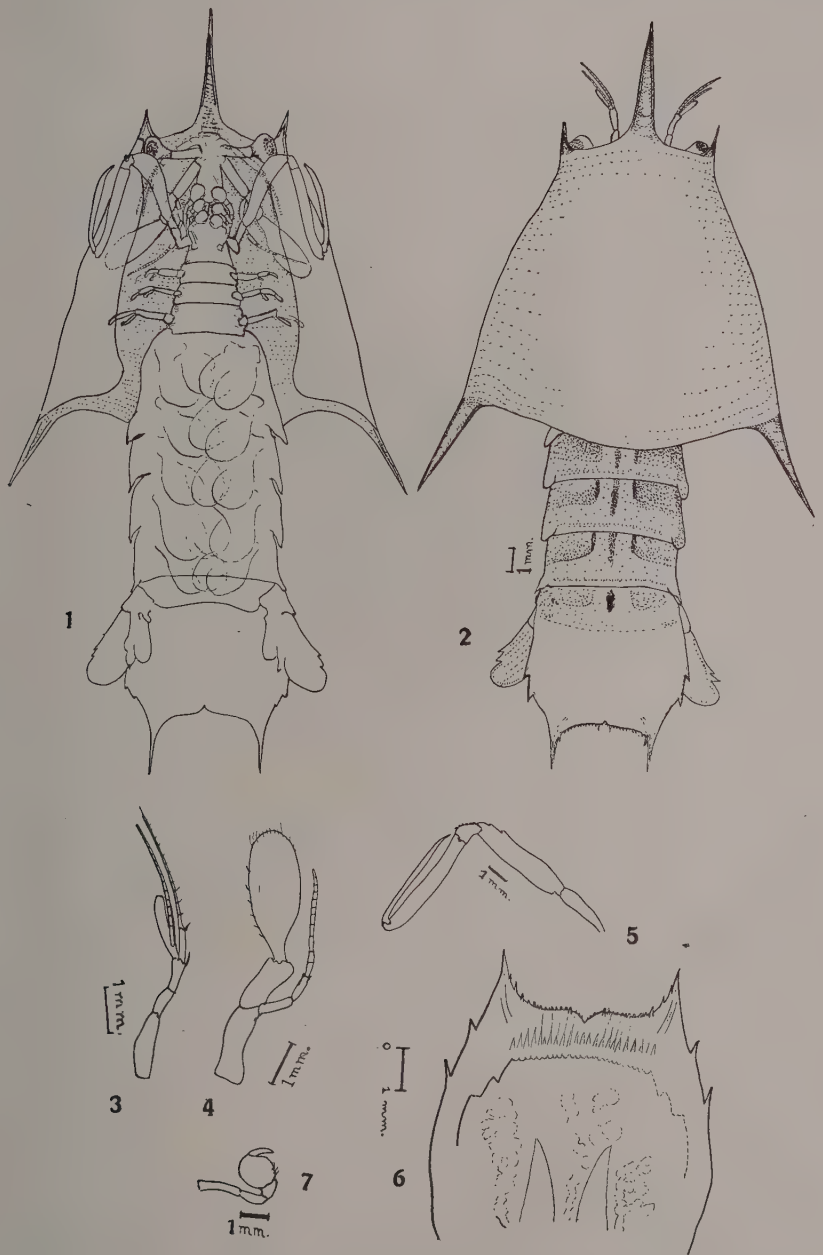
Côr — amarelo pálido; translúcida quase transparente.

Medidas — Comprimento — 32 mms. As figuras 2, 3, 4, 5, 6 e 7 tem a indicação ao lado em milímetros.

Material — Um único exemplar, capturado por nós na enseada de Jurujuba, em 9 de Agosto de 1939, misturado com o lixo atirado pelas ondas em duas pedras situadas a 22º 55' 52" Lat. S. e 43º 06' 07" Long. W. Greenw, ao nível do mar.

EXPLICAÇÃO DA ESTAMPA

Fig. 1 — *Squillerichtus Aragaoi*, vista ventral.
Fig. 2 — *Squillerichtus Aragaoi*, vista dorsal.
Fig. 3 — *Squillerichtus Aragaoi*, antênula.
Fig. 4 — *Squillerichtus Aragaoi*, antena.
Fig. 5 — *Squillerichtus Aragaoi*, pata raptorial.
Fig. 6 — *Squillerichtus Aragaoi*, telson.
Fig. 7 — *Squillerichtus Aragaoi*, 3.º apêndice torácico.



LEJEUNE P. H. DE OLIVEIRA — Sôbre uma nove espécie de *Crustacea Stomatopoda*: *SQUILLERICHTUS ARAGAOI*

Estudo sobre Flebotomus no Vale Amazonico. Parte I. Descrição de F. marajoensis, F. pilosus, F. souzacastroi e F. christophersoni (*)

(Diptera: Psychodidae)

por

R. G. Damasceno e O. R. Causey

(Com 25 Figuras no texto)

Os estudos e observações em que se baseia esta publicação foram executados com o apôio e sob os auspícios do Serviço Especial de Saúde Pública, mantido pelo Ministério da Educação e Saúde do Brasil e pelo Coordenador dos Assuntos Inter-Americanos.

Para orientar as investigações sôbre a transmissão das Leishmanioses no Vale Amazônico foi feito um estudo sistemático dos insetos do gênero *Flebotomus*, de agosto de 1942 a junho de 1944. Neste período coletou-se um total de 50,853 exemplares, dos quais 30710 machos e 13,143 fêmeas foram examinados e identificados. Entre êstes foram encontrados exemplares pertencentes a 40 espécies prèviamente conhecidas e a 23 espécies novas. A finalidade da presente publicação é descrever quatro das novas espécies mais afins.

O material original consistiu de exemplares adultos capturados dentro de casas ou fora delas em isca animal, armadilhas luminosas, tocas de animais, ocos em troncos de árvores ou fenda de árvores na floresta. Algumas fêmeas foram isoladas para oviposição e os exemplares restantes mortos pelo clorofórmio e conservados em álcool para estudo futuro. Dos ovos obtidos em papel de filtro úmido conseguiu-se criar adultos o que proporcionou dados sôbre tôdas as fases evolutivas e ambos os sexos provenientes de uma mesma oviposição.

Flebotomus marajoensis n. sp.

TIPOS. Holotipo macho e um paratipo, capturados por um dos autores em isca animal (cavalo) em fevereiro de 1943, na fazenda Santo Antônio,

* Recebido para publicação a 16 de setembro e dado à publicidade em outubro de 1944.

no Municipio de Ponta de Pedras, Ilha do Marajó, e mais três paratipos machos em cavidade de árvores, em março de 1944, no sitio Cavado, Rio Ituquí, Município de Santarém, Estado do Pará. O holotipo será depositado no National Museum, Washington, D.C. e 1 paratipo no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

DESCRIÇÃO

Tamanho cêrca de 2 mm e côr geral castanho clara.

CABEÇA mais larga do que longa, com 252μ de comprimento por 261μ de largura. *Clípeo* medindo 126μ de comprimento, sendo de 2.0 a relação entre o comprimento total da cabeça e o do clípeo. *Palpos* (Estampa I, figura 4) muito longos, com 668μ de comprimento total, medindo os diversos artículos:

I — 28μ	V>I+ II+III
II — 92μ	V>I+III+IV
III — 128μ	Fórmula palpal:
IV — 100μ	I. II. IV. III. V
V — 320μ	

Antenas com os diversos artículos medindo:

III — 216μ	X — 90μ
IV — 108μ	XI — 90μ
V — 108μ	XII — 90μ
VI — 108μ	XIII — 90μ
VII — 108μ	XIV — 72μ
VIII — 108μ	XV — 63μ
IX — 99μ	XVI — 45μ

TÓRAX mede da borda anterior do mesonoto à posterior do escutelo 441μ. *Asas* (Estampa I, fig. 5) com 1750μ de comprimento por 455μ em sua maior largura medindo as diversas partes:

$\alpha = 320\mu$	Índice alar:
$\beta = 268\mu$	$\frac{\alpha}{\beta} = 1.2$
$\delta = 12\mu$	$\frac{\alpha}{\gamma} = 1.5$

$\gamma = 220\mu$ $\quad \frac{\alpha}{\delta} = 26.7$

$\frac{\text{Comprimento}}{\text{Largura}} = 3.8$

ABDOME normal.

GENITÁLIA (Estampa I, fig. 1, e Estampa V, fig. 22). *Gonapófise superior* com segmento basal de 288μ de comprimento por 100μ de largura na base, estreitando-se gradualmente para o ápice. Face interna com dois grupos de cerdas, um com cêrca de 12 cerdas fortes, longas, implantadas diretamente na porção média do segmento e outro com 15 a 20 cerdas idênticas à do primeiro, inseridas em sentido longitudinal, numa crista saliente que se dirige para a base da gonapófise. Falta no holotipo uma cerda forte e muito longa, implantada na face externa do segmento, próxima ao terço distal e que está presente no paratipo, montado na mesma lâmina. Segmento distal (Estampa I, fig. 3) com 135μ de comprimento por 27μ de largura máxima; apresenta quatro espinhos, sendo um terminal, um no terço distal, um entre êste e o terminal, implantado em tubérculo saliente e um proximo à metade basal do segmento. Além dêstes quatro espinhos existe uma cerda fina e reta, próxima ao espinho apical. *Gonapófise mediana* com 207μ de comprimento por 27μ de largura na base, largura que é mais ou menos uniforme até a porção mediana, onde existe um estreitamento; alarga-se em seguida, apresentando a face superior revestida de cerdas fortes, longas e recurvadas para a base. A face inferior na extremidade distal termina em curvatura brusca para cima, dando ao ápice um aspecto rombo; cerdas curtas, finas e esparsas revestem esta face até o início do estreitamento da gonapófise. *Gonapófise inferior* mais longa que o segmento basal da gonapófise superior, mede 344μ de comprimento por 36μ de largura. *Membranelas* curtas e estreitas. *Aparelho espicular* (Estampa I, fig. 2) com pompeta de 162μ e espículos de 243μ com extremidades dilatadas, em círculo.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

Das espécies conhecidas que apresentam caracteres morfológicos parecidos com os descritos para esta nova espécie, as que mais dela se aproximam são: *F. walkeri* Newstead, 1914 e *F. verrucarum* Townsend, 1913.

Destas difere o *F. marajoensis* por apresentar na gonapófise superior, além do grupo basal de cerdas, implantadas em uma crista e comum a ambas as espécies, um segundo grupo de cerdas esparsas com morfologia idêntica

à do primeiro, implantadas na região mediana do segmento. No terço distal externo do segmento basal da mesma gonapófise existe na nova espécie uma cerda forte e muito longa, ausente no *F. walkeri* e no *F. verrucarum*.

A gonapófise inferior de comprimento igual ao segmento basal da superior nessas duas espécies atinge a metade do segmento distal em *F. marajoensis*.

O índice palpal difere nas três espécies: em *F. walkeri* é 1.4.2.3.5., em *F. verrucarum* 1.4.3.2.5. e em *F. marajoensis* é de 1.2.4.3.5.

O índice alar de *F. marajoensis*, $\frac{\alpha}{\beta} = 1.2$, é muito semelhante ao de *F. walkeri*, $\frac{\alpha}{\beta} = 1$; entretanto difere do de *F. verrucarum* que é de $\frac{\alpha}{\beta} = 2.3$.

Flebotomus pilosus n. sp.

TIPOS. Holotipo macho capturado em Belém, no bairro de Santa Isabel (Itaragé Tucunduba), quatro paratipos no bairro de Utinga, três no bairro de Cremação, Município de Belém e dois na Mata João Rodrigues, Município de João Coelho, todos em cavidades de árvores, no Estado do Pará, no período de fevereiro a abril de 1944. O holotipo será depositado no National Museum, Washington, D.C. e um paratipo no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

DESCRIÇÃO

Tamanho cêrca de 1.5 mm e côr geral amarelo-palha.

CABEÇA mais larga do que longa, com 198μ de comprimento por 288μ de largura. *Clípeo* medindo 90μ de comprimento por 63μ de largura, sendo de 2.2 a relação entre o comprimento total da cabeça e o do clípeo. *Palpos* (Estampa II, fig. 8) muito longos, com 733μ de comprimento total, medindo os diversos artículos:

I — 33μ	
II — 92μ	V>I+II+III+IV
III — 140μ	Formula palpal
IV — 100μ	I. II. IV. III. V
V — 368μ	

Antenas com os diversos artículos medindo:

III — 270μ	VI — 117μ
IV — 117μ	VII — 117μ
V — 126μ	VIII — 117μ

IX — 108μ	XIII — 90μ
X — 108μ	XIV — 72μ
XI — 108μ	XV — 54μ
XII — 99μ	

TÓRAX mede da borda anterior do mesonoto à posterior do escutelo 432μ. *Asas* (Estampa II, fig. 10) com 1400 μ de comprimento por 380μ em sua maior largura, com as diversas partes, medindo:

$\alpha = 300\mu$	Índice alar:
$\beta = 280\mu$	$\frac{\alpha}{\beta} = 1.1$
$\delta = 120\mu$	$\frac{\alpha}{\gamma} = 1.7$
$\gamma = 176\mu$	$\frac{\alpha}{\delta} = 2.5$
	$\frac{\text{Comprimento}}{\text{Largura}} = 3.7$

Pernas relativamente curtas medindo:

Anteriores	*Medianas*	*Posteriores*
Fêmur 640μ	Fêmur 620μ	Fêmur 660μ
Tíbia 540μ	Tíbia 680μ	Tíbia 880μ
1.º Tarso 300μ	1.º Tarso 380μ	1.º Tarso 440μ
2.º Tarso 195μ	2.º Tarso 212μ	2.º Tarso 216μ
3.º Tarso 135μ	3.º Tarso 136μ	3.º Tarso 140μ
4.º Tarso 120μ	4.º Tarso 128μ	4.º Tarso 120μ
5.º Tarso 90μ	5.º Tarso 96μ	5.º Tarso 84μ

ABDOME muito longo.

GENITÁLIA (Estampa II, fig. 6 e Estampa V, fig. 23). Pequena em relação a ocorpo, cêrca de 3.5 vêzes menor do que o comprimento do abdome. *Gonapófise superior* com segmento basal curto, com 207μ de comprimento por 72μ de largura, mais ou menos uniforme até à extremidade distal, não apresentando tufos de cerdas na base. A face interna a partir da metade apical

é revestida por numerosas cerdas longas e finas que atingem à metade basal do segmento distal. Segmento distal (Estampa II, fig. 7) com 140μ de comprimento por 28μ na sua maior largura; apresenta 3 espinhos longos, dos quais um apical, um próximo ao têrço distal implantado em tubérculo saliente e um no meio de segmento. *Gonapófise mediana* maior do que o segmento basal da superior, mede de comprimento 216μ. É achatada dorso ventralmente a partir do terço basal onde existe um estreitamento à custa das faces superior e inferior, permanecendo de largura mais ou menos uniforme e com ligeira curvatura para cima até à extremidade distal. Face superior com bordos salientes, revestida de cerdas retas e dirigidas para a base, até o estreitamento mediano. Face inferior nua, com um agrupamento de cerdas no cotovelo existente no início da dilatação basal. *Gonapófise inferior* curta e grossa, é menor que o comprimento da intermediária, mede 198μ de comprimento por 45 μ de largura, sendo mais ou menos uniforme até o ápice; é resvestida de cerdas retas e longas, mais numerosas na extremidade distal. Lamela submediana larga e longa, apresentando cerdas curtas e retas. *Aparelho espicular* com gubernáculo triangular, fortemente quitinizado, de ponta fina com base dilatada. Pompeta (Estampa II, fig. 9) larga, com 208μ de comprimento. Espículos grossos e curtos medindo 261μ de comprimento, com extremidades dilatadas e de forma característica.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

F. pilosus n. sp. apresenta caracteres morfológicos que o afastam fàcilmente de tôdas as outras espécies. Gonapófise mediana com a metade distal da face interna densamente revestida por cerdas finas e longas, semelhantes a pêlos. Segmento distal só com três espinhos, um terminal, um no terço distal e um no meio de segmento. Gonapófise intermediária de forma característica e mais longa do que a inferior ou o segmento basal da superior. Palpos com o V artículo muito longo, o índice palpal igual a V>I+II+III+IV. Êstes caracteres o tornam fàcilmente distinto de qualquer dos outros *Flebotomus* conhecidos.

Flebotomus souzacastroi n. sp.

TIPOS. Holotipo macho e um paratipo capturados em cavidade de árvore, na mata da Catinga, no Município de São Paulo de Olivença, Rio Solimões, Estado do Amazonas. O holotipo será depositado no National Museum, Washington, D.C. e um paratipo no Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. Espécie dedicada ao Dr. Antonino Emiliano de Sousa Castro.

DESCRIÇÃO

Tamanho cêrca de 2 mm e côr geral castanho-escura.

CABEÇA castanho-escura com cêrca de 360μ de comprimento total. *Clipeo* pequeno, pouco maior do que os toros antenais, com 75μ de comprimento, sendo de 4.8 a relação entre o comprimento total da cabeça e o do clípeo. *Palpos* (Estampa III, fig. 15) com 468μ de comprimento total, medindo os diversos artículos:

I — 32μ
II — 100μ
III — 116μ
IV — 52μ
V — 168μ

Índice palpal:
I. IV. II. III. V

Antenas medindo os diversos artículos:

III — 248μ
IV — 128μ
V — 128μ
VI — 128μ
VII — 128μ
VIII — 120μ
IX — 120μ
X — 120μ
XI — 120μ
XII — 120μ
XIII — 116μ
XIV — 92μ
XV — 52μ

TÓRAX com mesonoto castanho-escuro, escutelo, balancins, pleuras, coxas e pernas palidos. *Asas* (Estampa III, fig. 16) com 1900 de comprimento por 560 em sua maior largura com as diversas partes medindo:

$\alpha = 420\mu$
$\beta = 212\mu$
$\delta = 152\mu$
$\gamma = 160\mu$

Índice alar:

$$\frac{\alpha}{\beta} = 2.1$$

$$\frac{\alpha}{\gamma} = 2.6$$

$$\frac{\alpha}{\delta} = 2.8$$

$$\frac{\text{Comprimento}}{\text{Largura}} = 3.4$$

Pernas longas, medindo:

Anteriores	*Medianas*	*Posteriores*
Fêmur 880μ	Fêmur 780μ	Fêmur 860μ
Tíbia 1470μ	Tíbia 1620μ	Tíbia 2020μ
1.º Tarso 1090μ	1.º Tarso 1000μ	1.º Tarso 1000μ
2.º Tarso 320μ	2.º Tarso 320μ	2.º Tarso 340μ
3.º Tarso 220μ	3.º Tarso 220μ	3.º Tarso 212μ
4.º Tarso 160μ	4.º Tarso 164μ	4.º Tarso 160μ
5.º Tarso 112μ	5.º Tarso 104μ	5.º Tarso 100μ

ARDOME castanho-claro.

GENITÁLIA (Estampa III, fig. II e Estampa V, fig. 24). *Gonapófise superior* (segmento basal mais segmento distal) com 633μ de comprimento. O segmento basal mede 351μ de comprimento por 72μ de largura. Não apresenta tufos de cerdas na face interna. Segmento distal com 189μ de comprimento por 36μ de largura máxima. Neste segmento se inserem quatro espinhos fortes e longos, sendo um terminal, um próximo ao têrço distal e dois ao mesmo nível na porção mediana do segmento. Não existe cerda fina próxima ao espinho apical. *Gonapófise mediana* com 208μ de comprimento, por 60μ de largura na base, mais ou menos uniforme até próximo ao terço distal, onde sofre um estreitamento brusco a custa da face inferior e em linha quase vertical, dirigida para cima; termina em haste cilíndrica, que é revestida em ambas as faces por cerdas longas e finas dirigidas para a base. Na parte mais larga da gonapófise (face inferior) existe um grupo de cerdas de morfologia idêntica às que revestem o têrço distal desta mesma gonapófise. *Gonapófise inferior* com 300μ de comprimento por 28μ de largura, mais ou menos uniforme até a extremidade apical. Lamela submediana longa e estreita. *Aparelho espicular* com gubernáculo triangular de base larga e ápice rombo. Pompeta (Estampa III, fig. 14) com 207μ de comprimento. Espículos grossos, rígidos, medindo 657 μ de comprimento.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

Flebotomus souzacastroi está incluído entre as espécies que apresentam o V artículo dos palpos o mais longo. Segmento basal da gonapófise superior sem tufo de cerdas na face interna. Segmento distal com quatro espinhos, não existindo cerdas fina próxima ao espinho terminal. Gonapófise mediana inerme. Gonapófise inferior também inerme e do mesmo tamanho ou menor que o seg-

mento basal da superior. Femures posteriores inermes. Com êstes caracteres existem as seguintes espécies americanas:

Flbotomus shannoni Dyar, 1929.
Flebotomus monticulus Costa Lima, 1932.
Flebotomus limai Fonseca, 1935.
Flebotomus pestanai Barreto e Coutinho, 1941.
Flebotomus lanei Barreto e Coutinho, 1941.
Flebotomus minasensis Mangabeira, 1942.
Flebotomus dendrophylus Mangabeira, 1942.
Flebotomus souzacastroi afasta-se fàcilmente de qualquer uma delas pela forma característica (em cutelo) da gonapófise mediana.

Flebotomus christophersoni n. sp.

Tipos. Holotipo macho e dois paratipos capturados por um dos autores em troncos de arvore, no Sítio Santo Antônio, Município de Santarém, no Estado do Pará, e dois paratipos capturados em tronco de árvore, um em Itaúna, Município de Parintins, Estado do Amazonas e outro em Tucunduba, Município de Beém, Estado do Pará. O holotipo será depositado no National Museum, Washington, D. C. e um paratipo no Instituto Osvaldo Cruz, Rio de Janeiro. A nova espécie é descrita em homenagem ao Doutor E. H. Christopherson, Superintendente do Serviço Especial de Saúde Publica, Brasil.

DESCRIÇÃO

Tamanho cêrca de 2.5 mm de comprimento e côr geral castanho-claro.

cabeça mais larga do que longa, com 279μ de comprimento por 378μ de largura. *Clípeo* pequeno medindo 90μ de comprimento, sendo 3.1 a relação entre o comprimento total da cabeça e do clípeo. *Palpos* (Estampas IV, figura 20) com 454μ de comprimento total, medindo os diversos artículos:

I — 27μ
II — 117μ
III — 99μ
IV — 54μ
V — 157μ

Índice palpal:
I. IV. III. II. V
V>III+IV

Antenas medindo os articulos presente:

III — 270μ
IV — 135μ
V — 135μ
VI — 135μ
VII — 135μ
VIII — 126μ

TÓRAX mede da borda anterior do mesonoto à posterior do escutelo 495μ. *Asas* (Estampa IV, fig. 21) com 1810μ de comprimento por 497μ em sua maior largura, medindo as diversas partes :

$\alpha = 390\mu$ Índice alar:

$\beta = 284\mu$ $\frac{\alpha}{\beta} = 1.4$

$\delta = 88\mu$ $\frac{\alpha}{\gamma} = 1.6$

$\gamma = 248\mu$ $\frac{\alpha}{\delta} = 4.4$

$\frac{\text{Comprimento}}{\text{Largura}} = 3.6$

Pernas com as seguintes medidas:

Anteriores	*Medianas*	*Posteriores*
faltam no exemplar	Fêmur 745μ	Fêmur 781μ
	Tíbia 1668μ	Tíbia 1775μ
	1.° Tarso 1100μ	1.° Tarso 1207μ
	2.° Tarso 319μ	2.° Tarso 319μ
	3.° Tarso 177μ	3.° Tarso 177μ
	4.° Tarso 142μ	4.° Tarso 142μ
	5.° Tarso 106μ	5.° Tarso 106μ

ABDOME normal.

GENITÁLIA (Estampa IV, fig. 17 e Estampa V, fig. 25). *Gonapófise superior* com segmento basal de 280μ de comprimento por 70μ de largura, permanecendo mais ou menos uniforme até próximo ao ápice onde se estreita à custa da face inferior; não apresenta tufo de cerdas na face interna. Segmento distal com 282μ de comprimento por 42μ de largura, apresenta quatro espinhos relativamente longos dispostos, um terminal, o mais forte, um no têrço distal e dois medianos implantados no mesmo nível. *Gonapófise* mediana (Estampa IV, fig. 18) com 217μ de comprimento por 56μ de largura na base, apresenta-se uniforme até próximo à metade basal, onde a face inferior dilata-se em cotovelo, para em seguida estreitar-se gradativamente até o ápice. A face superior na região mediana apresenta um agrupamento de cerdas finas

e longas que se estendem até o ápice onde, porém, são menos numerosas. A face inferior é revestida de cerdas relativamente finas e curtas. *Gonapófise* inferior pouco maior que o segmento basal da superior, medindo 308μ de comprimento. Membranelas longas e estreitas. *Aparelho espicular* com gubernáculo triangular curto, de base larga e pompeta (Estampa IV, fig. 19) com 144μ de comprimento; espículos delgados, cêrca de três vêzes maiores que o comprimento da pompeta.

DISCUSSÃO TAXONÔMICA

Flebotomus christophersoni pertence ao grupo de *Flebotomus* nos quais o V artículo dos palpos é o mais longo, os fêmures posteriores são inermes, o segmento basal da gonapófise superior sem tufo de cerdas, o segmento distal com quatro espinhos e sem a cerda fina implantada na base do espinho terminal. Das espécies conhecidas nesse grupo,*F. lanei* Barreto e Coutinho, 1941 parece a mais próxima de *christophersoni*. Esta nova espécie se diferencia fàcilmente de *lanei* por apresentar na gonapófise mediana um agrupamento de cerdas finas e longas inseridas na face superior da região mediana, o que se não observa em *F. lanei*.

SUMÁRIO

Na presente publicação são descritas quatro espécies novas de *Flebotomus* de Região Amazônica do Brasil. Estas espécies foram designadas como *F. marajoensis, F. pilosus, F. souzacastroi* e *F. christophersoni*.

F. marajoensis parece ser mais próximo de *F. walkeri* Newstead, 1914 e *F. verrucarum* Townsend, 1913. Dêstes difere o *F. marajoensis* por apresentar na gonapófise superior, além do grupo basal de cerdas, implantadas em uma crista e comum a ambas aquelas espécies, um segundo grupo de cerdas esparsas, com morfologia idêntica à do primeiro grupo, implantadas na região mediana.

F. pilosus com suas numerosas cerdas no segmento basal da gonapófise superior e uma combinação de outros caracteres da genitália do macho, difere por completo das demais especies conhecidas.

F. souzacastroi é afim a *F. shannoni* Dyar, 1929, mas pode ser dêle fàcilmente separado por possuir a gonapófise mediana em forma de cutelo.

F. christophersoni aproxima-se muito de *F. lanei* Barreto e Coutinho, 1941. No entanto *F. christophersoni* se diferencia fàcilmente de *F. lanei* pela presença de cerdas finas e longas inseridas na face superior da região mediana, o que não se observa em *F. lanei*.

REFERÊNCIAS

BARRETO, M. P. e COUTINHO, J. O.

1941. *Contribuição ao conhecimento dos Flebotomus de São Paulo.* — IV. — Descrição de Três Novas Espécies (1). Papéis Avulsos do Dep. Zool. Secr. Agric. São Paulo, I : 143-158.

DYAR, H. G.

1929. *The Present Knowledge of the American Species of Phlebotomus Rondani (Diptera, Psychodidae).* *Amer. Jour. of Hyg.*, 10 : 112-124.

MANGABEIRA FILHO, O.,

1942. *7.ª Contribuição ao Estudo dos Flebotomus (Diptera-Psychodidae).* Descrição dos Machos de 24 Novas Espécies, Mem. do Inst. Oswaldo Cruz, 37:111-218.

NEWSTEAD, R.

1914. *Notes on Phlebotomus with Descriptions of New Species.* Part. II. Bull. Ent. Res., 5:188-190.

TOWNSEND, C. H. T.

1913. *Preliminary Characterization of the Vector of Verruga, Phlebotomus verrucarum sp. n.* Ins. Ins. Mens., 1:107-109.

ESTAMPA 1

Flebotumos marajoensis n. sp.

(Desenhos feitos em câmara clara)

Fig. 1 — Genitália do macho.
Fig. 2 — Pompeta.
Fig. 3 — Segmento distal da gonapófise superior.
Fig. 4 — Palpos.
Fig. 5 — Asa.

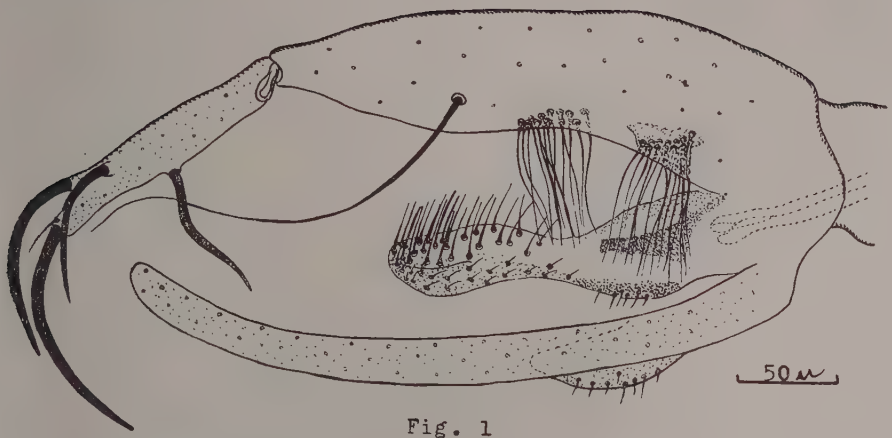


Fig. 1

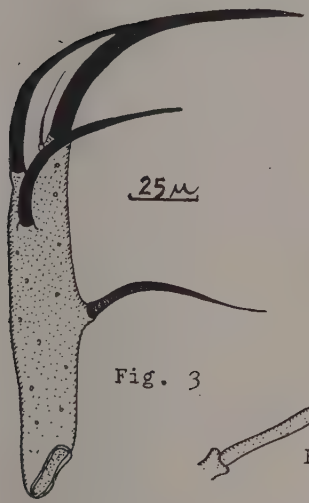


Fig. 3

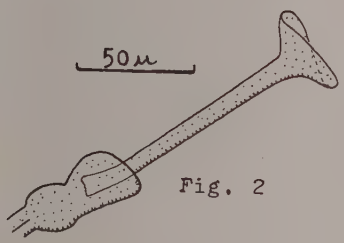


Fig. 2

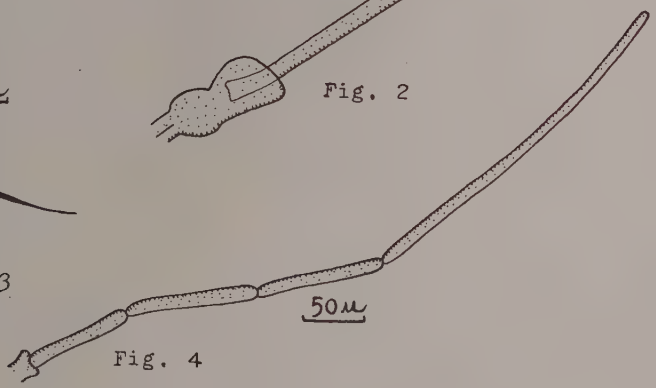


Fig. 4

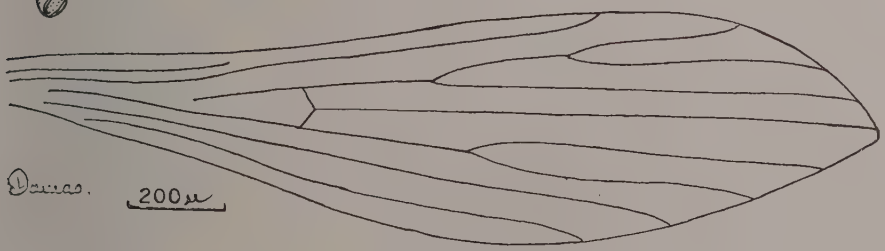


Fig. 5

ESTAMPA 2

Flebotomus pilosus n. sp.

(Desenhos feitos em câmara clara)

Fig. 6 — Genitália do macho.
Fig. 7 — Segmento distal da gonapófise superior.
Fig. 8 — Palpos.
Fig. 9 — Pompeta.
Fig. 10 — Asa.

Fig. 6

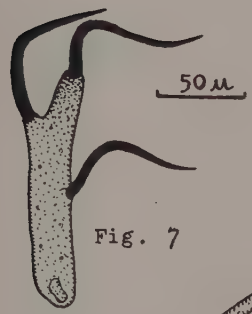


Fig. 7

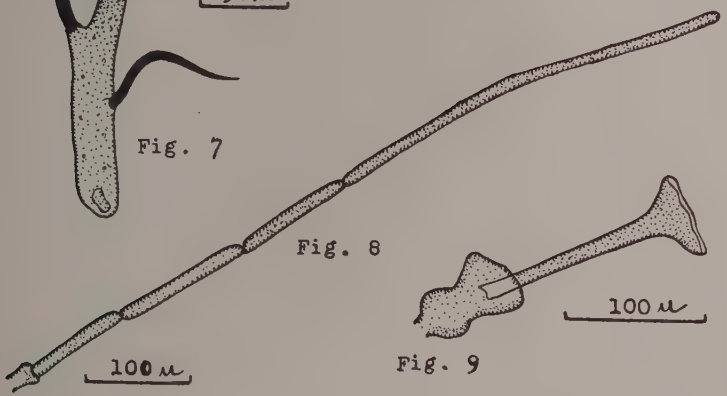


Fig. 8

Fig. 9

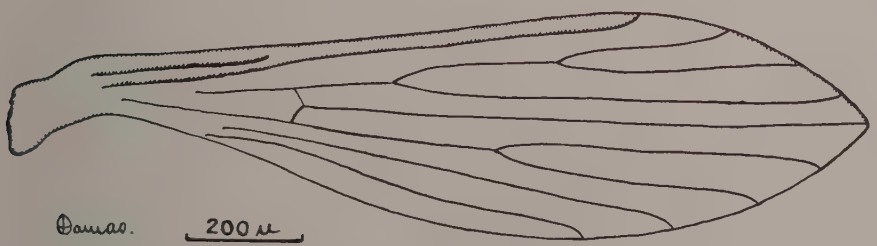


Fig. 10

ESTAMPA 3

Flebotomus souzacastroi n. sp.
(Desenhos feitos em câmara clara)

Fig. 11 — Genitália do macho.
Fig. 12 — Gonapófise mediana.
Fig. 13 — Segmento distal da gonapófise superior.
Fig. 14. — Pompeta.
Fig. 15 — Palpos.
Fig. 16 — Asas.

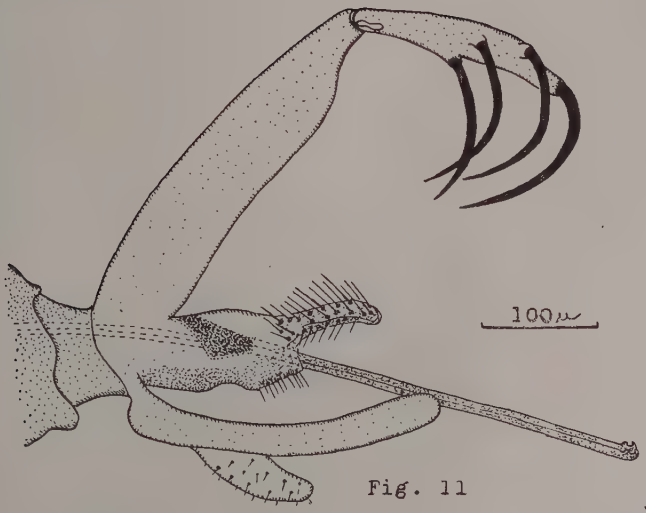


Fig. 11

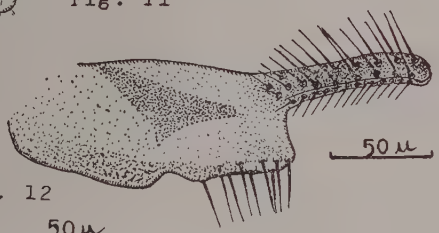


Fig. 12

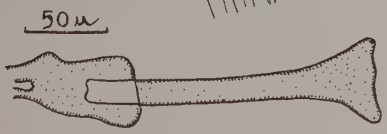


Fig. 14

Fig. 15

Fig. 13

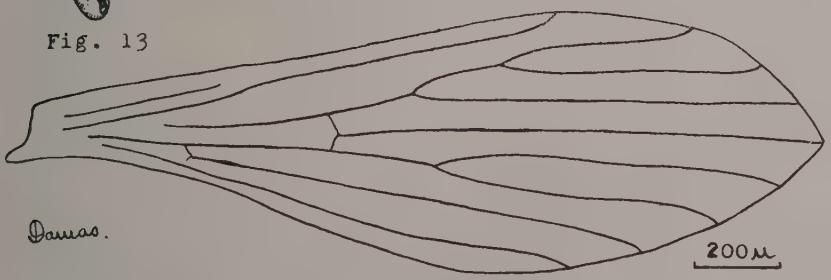


Fig. 16

ESTAMPA 4

Flebotomus christophersoni n. sp.
(Desenhos feitos em câmara clara)

Fig. 17 — Genitália do Macho.
Fig. 18 — Gonapófise mediana.
Fig. 19 — Pompeta.
Fig. 20 — Palpos.
Fig. 21 — Asa.

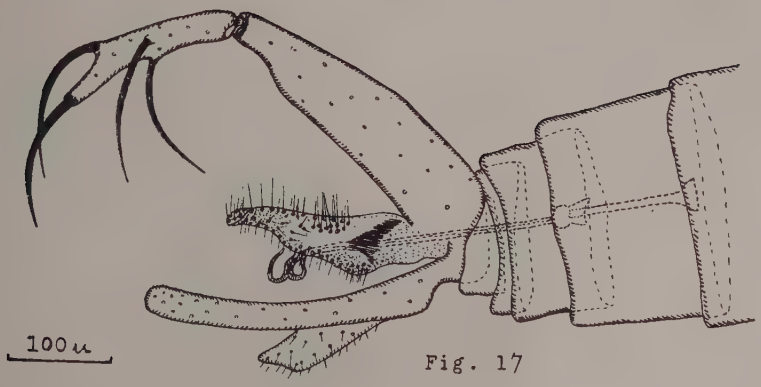


Fig. 17

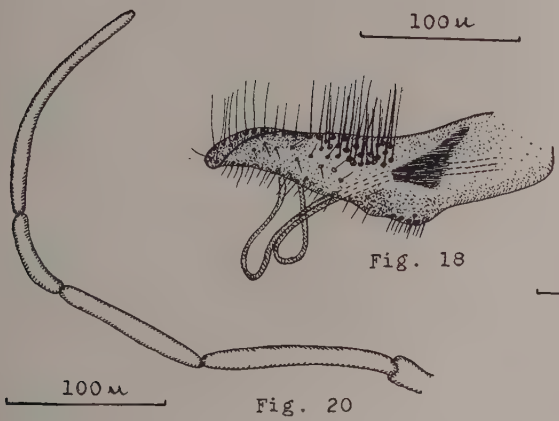


Fig. 18

Fig. 20

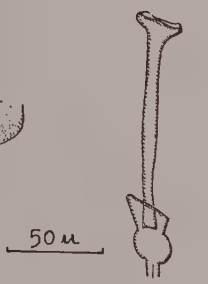


Fig. 19

Fig. 21

ESTAMPA 5

(Microfotografias)

Fig. 22 — Genitália do macho de *F. marajoensis n. sp.*
Fig. 23 — Genitália do macho de *F. pilosus n. sp.*
Fig. 24 — Genitália do macho de *F. souzacastroi n. sp.*
Fig. 25 — Genitália do macho de *F. christophersoni n. sp.*

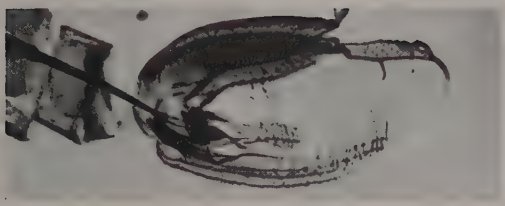


Fig. 22

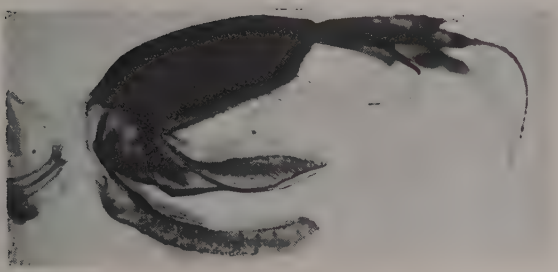


Fig. 23

Fig. 24

Fig. 25

Estudos sôbre o pneumococo (*)

1.ª nota — Experiência sôbre a produção de peróxido pelo pneumococo e reação para evidenciá-la.

por

J. Guilherme Lacorte, Humberto T. Cardoso e Mario Santos

No decorrer dos nossos estudos sôbre o pneumococo verificamos que a produção de peróxido constitue uma das propriedades constantes nas amostras recentemente isoladas. O peróxido produzido é o $H_2 O_2$.

Inúmeros autores têm procurado esclarecer o papel que êsse peróxido possa desempenhar. Sabemos, como fato importante, que a sua produção aumenta a acidez do meio e que esta, por sua vez, prejudica a virulência do germe.

Nosso intuito, no presente trabalho, foi verificar em que condições se dá essa formação e os requisitos ótimos para a mesma.

As técnicas adotadas para evidenciá-la são complexas. Recorremos a reação simples, ainda não usada para êsse fim, que identifica diretamente o peróxido no meio de cultura, sem qualquer exigência particular. Procedemos da seguinte maneira:

As culturas são feitas em meio de Cotoni líquido e, depois de 18 horas de estufa a 37° C, juntam-se 10 gotas da solução a 10% de iodeto de potássio, recentemente preparada. Em seguida, igual quantidade de HCl 1/1. Acrescenta-se ràpidamente o clorofórmio e agita-se. Quando êste adquire coloração rósea a reação é positiva, isto é, houve produção de peróxido. Juntando-se goma de amido esta se torna escura pela libertação do iodo.

A reação é bastante sensível, de leitura fácil, sem possibilidade de deixar dúvidas.

Fizemos as nossas experiências com tipos de pneumococos de 1 a 27, provenientes dos Estados Unidos e 18 amostras recentemente isoladas por nós, de casos humanos. Verificamos que sòmente as amostras virulentas produziram peróxido reconhecível pela reação acima descrita.

* Recebido para publicação a 16 de setembro e dado à publicidade em outubro de 1944.

Experiments on the production of peroxide by pneumococcus and reaction to furnish evidence of it.

In the course of our studies on pneumococcus, we found that the production of peroxide constitutes one of the constant properties of recently isolated strains. The peroxide produced is H_2O_2.

A great number of authors regard as an important fact the rôle which this peroxide can play. As we know, its production increases the acidity of the medium, a condition which in its turn is detrimental to the virulence of the germ.

Our aim in the present work was to check conditions in which this production comes to pass as well as the optimum requisites of same.

The techniques employed in order to put it into evidence are complicated. We have recourse to a simple reaction not yet used for this purpose and which directly identifice the peroxide in the culture medium without any particular requirement. Our proceeding is as follows:

Cultures are made on Cotoni's liquid medium, and after 18 hours of incubator at 37° C. ten drops of a fresh 10% potassium iodide solution are added, and soon after an equal quantity of HCl 1/1. Chloroform is quickly added and the tube shaken. When the chloroform gets a rosy colour, the reaction is positive, i. e. production of peroxide has taken place. On adding a starch solution, this becomes dark owing to free iodine. The reaction is fairly sensitive, reads easily, without possibility of allowing any doubt.

Our experiments were made with pneumococcus types from 1 to 27 coming from the U. S. A. and with 18 strains recently isolated by ourselves from human cases. We have found that only virulent strains produced peroxide detectable by the afore said reaction.

Estudos sôbre o pneumococo (*)

2.ª nota — Relação entre a virulência do pneumococo, a sua lisibilidade pela bile e a capacidade de formar peróxido

por

J. Guilherme Lacorte e Mario Santos

A interpretação do fenômeno da lise do pneumococo pela bile é obscura. A maioria dos autores considera-a conseqüente à ação de um enzima. O fáto é que se observa com freqüência nas amostras virulentas do germe.

Por outro lado, a produção do peróxido de hidrogênio é também observada comumente nas culturas dêsse microorganismo. E' também conhecida a sua ação antienzimática.

Nas nossas experiências visamos verificar êsses diferentes aspectos, aparentemente contraditórios, da biologia do germe.

Para êsse fim utilizamos 45 amostras de pneumococos, sendo 27 provenientes do Estados Unidos (tipos 1 a 27) e 18 isoladas por nós de casos de infecção humana.

As semeaduras foram feitas em meio de Cotoni líquido. Ao fim de 18 horas de estufa a 37° C foi o líquido da cultura dividido em três porções destinadas:

1, a verificar a solubilidade das bactérias na bile, pela reação clássica;

2, a inocular em camondongos, por via subcutânea e peritoneal, o depósito lavado e suspenso em água fisiológica de 4 cm3 do caldo de cultura;

3, a verificar a produção do peróxido pela reação do iodeto de potássio, que já descrevemos em nota anterior.

Chegamos, pela observação dos resultados, às seguintes conclusões:

1.°) As amostras de pneumococo lisáveis pela bile mostraram-se virulentas para o camondongo.

2.°) As amostras lisáveis pela bile produziram peróxido.

3.°) Houve amostras que não foram lisáveis pela bile e que produziram peróxido, se bem que em quantidade pouco apreciável.

* Recebido para publicação a 16 de setembro e dado à publicidade em outubro de 1944.

4.º) As amostras não lisáveis pela bile e que produziram peróxido foram menos virulentas para camondongos.

5.º) As amostras não lisáveis pela bile e que não produziram peróxido foram avirulentas para camondongos.

Relationship between the virulence of pneumococcus, its lysibility by gall and its capacity of producing peroxide

The interpretation of the lysis phenomenon of pneumococcus by gall is obscure. The majority of the authors consider it as consecutive to the action of an enzyme. As a matter of fact, it is frequently observed in virulent strains of the germ.

On the other hand, the production of hydrogen peroxide is also commonly observed on cultures of this micro-organism. Its antienzymatic action is also known.

In our experiments, our aim was to check these different, seemingly contradictory aspects in the biology of the germ.

For this purpose we used 45 pneumococus strains; 27 came from the U.S.A. (types 1 to 27) and 18 were isolated by ourselves from cases of human infection.

The transfers were made to Cotoni's liquid medium. After 18 hours of incubator at 37° C. the culture liquor was divided into three portions for the purpose of:

1) checking the solubility of the bacteria in gall by means of the classical reaction.

2) inoculating into mice, by subcutaneous and peritoneal ways, the deposit, washed and suspended in physiologic water.

3) detecting the production of peroxide by the potassium iodide reaction, already described in a preceding notice.

Studying the results, we arrived at the following conclusions:

1.º) The pneumococcus strains lysible by gall appeared to be virulent for mice.

2.º) The strains lysible by gall produced peroxide.

3.º) Strains were encountered which were not lysible by gall and which produced peroxide, although in quantities of scanty value.

4.º) The strains not lysible by gall and producing peroxide were less virulent for mice.

5.º) The strains not lysible by gall and which produced no peroxide were avirulent for mice.

Simpatogonioma da glândula suprarrenal em natimorto a termo (*)

Pelos doutores

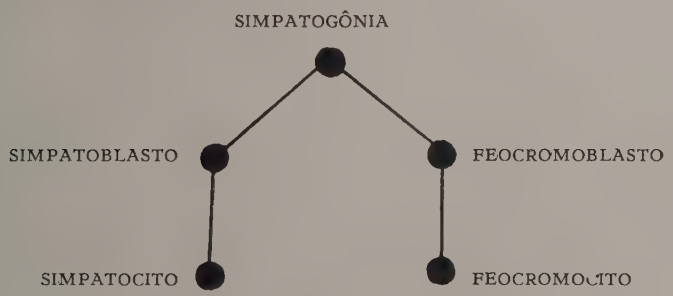
A. Penna de Azevedo e Jonio F. Sales

(Com 7 figuras no texto)

A dificuldade encontrada na interpretação microscópica dos tumores de origem nervosa simpática, perdurou até que puderam ser bem conhecidas a evolução embriológica e a diferenciação progressiva do elemento celular de origem, dotado de variações citológicas características. Assim, tumores que mostravam aspectos diferentes, passaram a ser apenas variedades histológicas de um mesmo grupo geral.

Tomando por base os aspectos embriológicos e até certo ponto, as propriedades fisiológicas, os tumores nervosos simpáticos constituem dois importantes grupos, ambos derivados da dicotomização de uma célula originária comum, a simpatogônia, no sentido de uma diferenciação sucessiva, formando de um lado, os tumores de conceito essencialmente nervoso e do outro, tumores que possuem a mais, característica endócrina.

Tal conceito pode muito fàcilmente, ser representado pelo esquema de BIELCHOWSKY:



As proliferações blastomatosas originárias de tais elementos celulares, constituem os tumores neuroblásticos, ora sob a forma de tumores simpáticos

* Recebido para publicação a 21 de setembro e dado à publicidade em outubro de 1944.

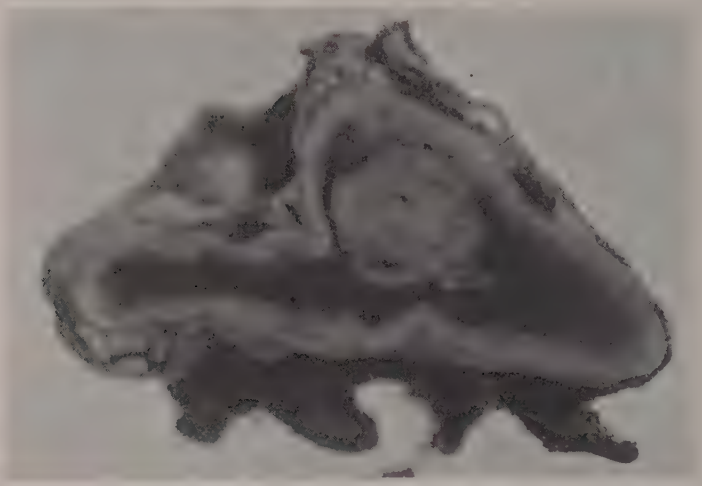


Fig. 1 — Glândula suprarrenal, observando-se na camada medular, uma formação nodular, constituida por tecido brancacento, estranho ao órgão. Fot. *J. Pinto*

Fig. 2 — Aspecto microscópico do tumor, comprometendo aparentemente, só a camada medular, X 75. Fot. *J. Pinto*

pròpriamente ditos, ora sob a forma de tumores cromafíns, conforme o grau e a orientação natural da diferenciação celular.

Na glândula suprarrenal, são de tal natureza os blastomas que se originam da camada medular, a sua caracterização dependendo tão sòmente, da fase evolutiva dos elementos citológicos que os compõem.

Entre as variações que têm sido descritas, cita-se o simpatogonioma, tumor imaturo, de significação maligna, podendo fornecer metástases para o fígado e gânglios linfáticos (tipo PEPPER) ou para o sistema ósseo (tipo HUTCHINSON) particularmente para os ossos do crânio.

O tumor localizando-se e originando-se na substância medular, é constituído por células pequenas, citoplasma muito escasso, núcleo geralmente redondo, mais raramente oval ou poligonal, possuindo nítida membrana e corando-se fortemente a sua densa cromatina (simpatogônia). A simpatogônia mede cêrca de 6 a 8 micra de diâmetro e pelas propriedades morfológicas, muito se assemelha às células linfóides. Além das células, pode existir substância intersticial de difícil evidenciação, a qual nos casos em que houve apropriada fixação, aparece como fibrilas isoladas, muito delicadas, ou mesmo formando fino retículo que é possível evidenciar-se pelo v. GIESON, pelo MALLORY e particularmente pelo método de BIELCHOWSKY. Em virtude da sua morfologia, os primeiros casos de simpatogonioma foram considerados gliomas e outros, confundidos com o linfosarcoma ou com a sarcoma de células redondas, até que pelas novas técnicas histológicas, pôde ser individualizado definitivamente.

A hemorragia é um acontecimento muito constante na espessura dos tumores desta natureza, porém uma importante característica, é a particular disposição das suas células, em certas regiões, de modo a constituírem estruturas concêntricas designadas sob o nome de rosetas (Rosetten de KÜSTER, Sympathogonienkapseln de PICK, Gliaballen e Gliarosetten de SCHILDERN, Markballen do simpático de WIESEL), às vêzes difíceis de serem evidenciadas, chegando a formar agrupamentos celulares com cerca de 30 a 40 micra de diâmetro.

RIBBERT e KÜSTER foram os primeiros a descrever os tumores de células redondas da glândula suprarrenal, derivados do simpático, os quais não são muito freqüentes, geralmente encontrados em crianças nos primeiros anos de vida, ou mesmo com algumas semanas, ou ainda com horas apenas de vida. No caso de FISCHER, foi encontrado um simpatogonioma na suprarrenal esquerda em criança que viveu 36 horas, com metástases no fígado e nos gânglios linfáticos. Quando observados em indivíduos mais idosos, é comum verificar-se também certa diferenciação das simpatogônias em simpatoblastos. Assim ocorreu no caso de BARNEWITZ, em mulher de 37 anos. Entre os casos

Fig. 3 — O tumor substitui por completo, a camada medular. X 95.
Fot. *J. Pinto*

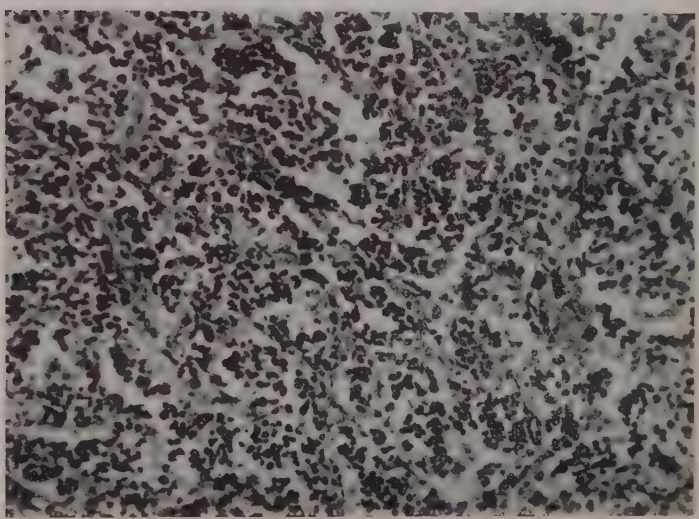


Fig. 4 — O tumor é constituido por células pequenas hipercromáticas, linfocitóides, esboçando ocasionalmente, a disposição em roseta. X 220
Fot. *J. Pinto*

de blastomas do simpático registrados na literatura nacional, citam-se os referidos por ELEJALDE e COSTA, em trabalho recente, descrevendo também um caso de simpatogonioma da suprarrenal, não relacionado à idade.

Em um caso de necropsia da Seção de Anatomia Patológica do Instituto Oswaldo Cruz, realizada no necrotério do Hospital São Francisco de Assis, tivemos a oportunidade de encontrar um pequeno tumor na glândula suprarrenal esquerda de um natimorto a têrmo. Trata-se de um feto do sexo masculino, de côr branca, bem conformado, medindo 48 cm. e pesando 3.200 g. (P. C. 12.110). Pelo exame das vísceras, foi evidenciado na glândula suprarrenal esquerda, um nódulo do tamanho aproximado de uma pequena avelã, medindo 8 x 5 mm de diâmetro, formado por tecido branco amarelado, úmido, úmido e opaco, de limites aparentemente regulares.

Ao exame microscópico dos cortes histológicos, verificaram-se a regular conservação da camada cortical e a estrutura de um blastoma da camada medular, constituído por células pequenas, redondas, de escasso citoplasma e núcleo denso e hipercromático. As células distribuem-se em arranjo alveolar, orientando-se pelo próprio estroma da glândula, sugerindo o aspecto de células de revestimento. Outras vêzes, apresentam-se em aglomerados mais ou menos densos. Agrupam-se raramente de modo concêntrico, quando passam a esboçar a disposição em rosetas. Algumas células já possuem maior quantidade de citoplasma e núcleo mais pálido e cromatina frouxa, adquirindo então, as características do simpatoblasto. As hemorragias são observadas em muitas regiões do tumor e menos freqüentemente, as zonas de necrose. Pela impregnação argêntica, não se verificam substância fibrilar intersticial nem prolongamentos celulares. A camada cortical da glândula sofre, em algumas àreas, acentuada infiltração das células tumorais.

RESUMO

Os AA descrevem um caso de tumor (simpatogonioma) originário da camada medular da glândula suprarrenal esquerda, em natimorto a têrno, da sexo masculino de côr branca, medindo 48 cm. e pesando 3.200 g. As células do tumor, pelas suas características, são consideradas simpatogônias, infiltrando também, a camada cortical, em algumas regiões.

Não foram encontrados focos metastáticos nos diferentes orgãos.

SUMMARY

The authors describe a case of tumor (simpathogonioma) originated from the medullar layer of the left adrenal gland in a stillborn of nine months. The tumor-cells are considered sympthononiae on account of their morphologic characteristics. Metastatic foci were not found in the different organs.

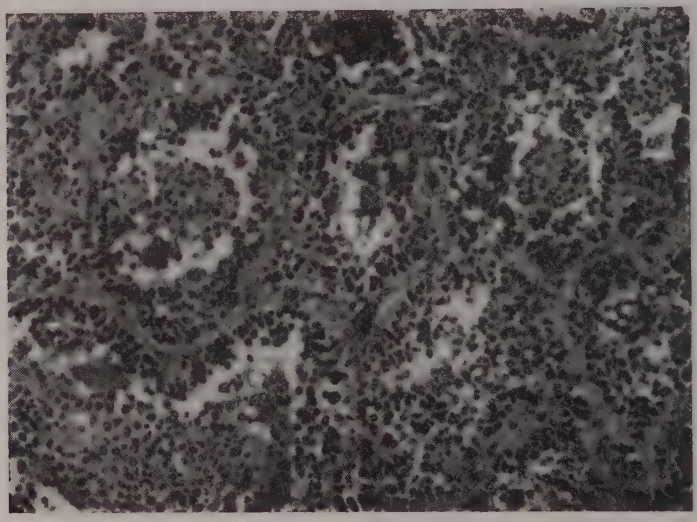


Fig. 5 — As células do tumor usam o próprio estroma conjuntivo da glândula. X 350. Fot. *J. Pinto*

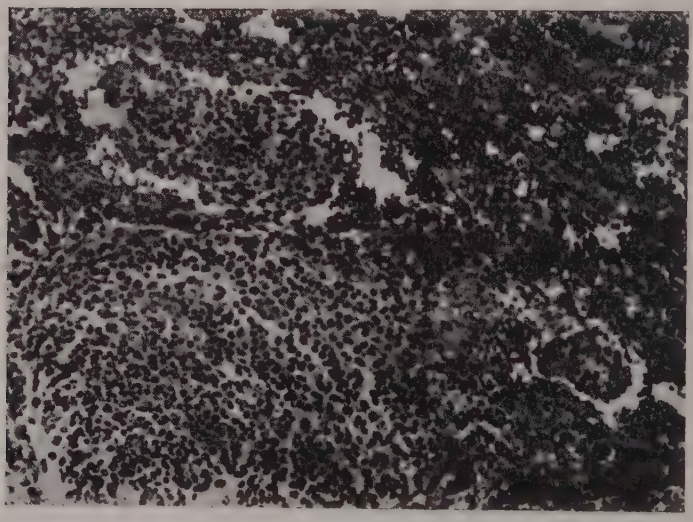


Fig. 6 — Observa-se, além das estruturas do tumor, a existência da hemorragia. X 350. Fot. *J. Pinto*

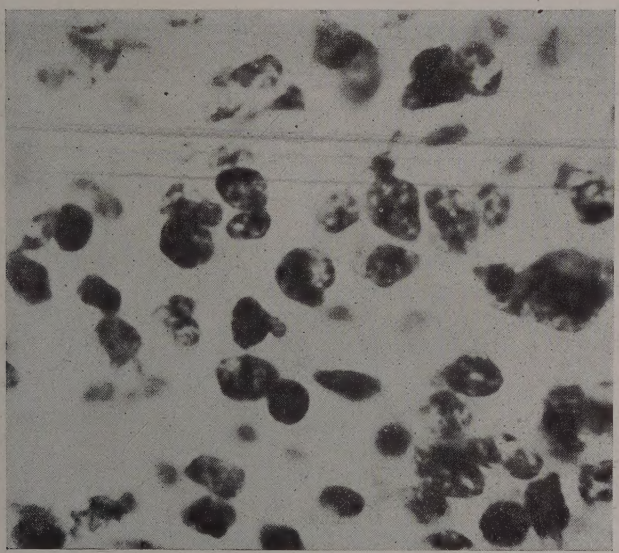


Fig. 7 — Algumas células apresentam a morfologia de simpatoblastos. X 950. Fot. *J. Pinto*

LITERATURA CONSULTADA

BARNEWITZ.

1922. Zur Kenntnis des Neuroblastoma sympathicum Frankf. Ztschr. f. Path. 26:317;

BIELCHOWSKY, MAX.

1932. Neuroblastic tumors of the sympathetic nervous system. Cytology a. Cellular Pathology of the Nervous System. III;1085.

ELEJALDE, PAULO e COSTA, NILTON

1944. Blastomas do simpático. Arq. Neuro-Psiq. II;133.

FISCHER, B.

1911. Maligner Tumor eines neugeborenen mit ausgedehnten Leber und Lymphdruesenmetastasen. Muench.med. Wchnschr. 58 : 2244.

SCHILDER, PAUL

1909. Ueber das maligne Gliom des sympathischen Nervensystems. Frankf. Ztschr. f. Path. 3 : 317.

DIETRICH, A. und SIEGMUND, H.

1926. Die Nebenniere und das chromaffine System. Handb der spez. path. Anat. u. Histol. VIII; 1039.

1945
IMPRENSA NACIONAL
RIO DE JANEIRO – BRASIL